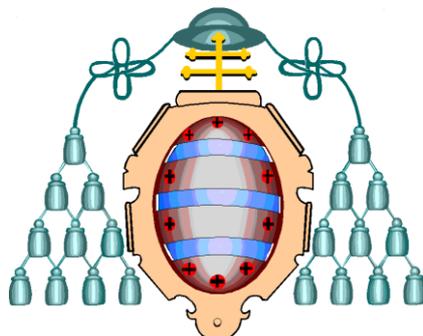


UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Departamento de Química Física y Analítica

Programa de Doctorado Análisis químico, bioquímico y estructural
avanzado (Mención de Calidad)

**DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS
PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES
ORGÁNICOS HALOGENADOS EN MUESTRAS DE
INTERÉS MEDIOAMBIENTAL MEDIANTE
ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS)**

TESIS DOCTORAL

ADRIANA GONZÁLEZ GAGO

Oviedo, 2012



llama en muchos materiales poliméricos que forman parte de gran variedad de productos de uso cotidiano. Estas sustancias se pueden liberarse con facilidad de su matriz dispersándose en su entorno, por lo que los niveles de concentración encontrados en muestras biológicas y medioambientales son cada vez más elevados. Los importantes efectos adversos relacionados con la exposición a PBDEs hacen necesario el control de estas sustancias en todo tipo de muestras de interés medioambiental. Las metodologías desarrolladas para la determinación de PBDEs se basaron en la técnica de análisis por dilución isotópica (IDA), caracterizada por la calidad de sus resultados analíticos en términos de exactitud y precisión. Para aprovechar todas las ventajas que ofrece IDA se trabajó en el modo específico, por lo que fue necesario sintetizar los compuestos marcados isotópicamente en ^{81}Br y purificarlos con el fin de obtener un trazador adecuado para esta aplicación. Dicho trazador fue caracterizado en abundancias isotópicas y en concentraciones y se evaluó su aplicabilidad a la determinación de PBDEs mediante IDA en términos de estabilidad y contaminación con sus análogos naturales. Finalmente se utilizó como trazador para la determinación de PBDEs en una muestra de pescado mediante GC-(EI)MS y en muestras de agua de río mediante GC-(NCI)MS.

RESUMEN (en Inglés)

Halogenated organic compounds are a wide group of substances which have been produced for years by the chemical industry for its use in all kind of applications. Consequently, these substances have been widely spread being found in all environmental compartments. The continuous exposure to this kind of pollutants can cause serious adverse effects in human health, which will mainly depend on the type of substance, the exposure time and the exposure degree. The great concern about the potential risks of halogenated organic pollutants exposure has lead to the development of new regulations with the aim to improve the protection of human health and the environment by performing risk assessment studies and setting maximum allowable concentrations.

In this regard, the development of simple, fast and reliable analytical methodologies for the determination of halogenated organic pollutants in biological and environmental samples is still needed. These methodologies usually require a sample preparation stage which usually involves several steps such as extraction of the analyte from the sample matrix, clean up and fractionation of the organic extract, followed by a chromatographic separation coupled to sensitive and selective detectors such as Mass Spectrometry (MS).

Therefore, the general aim of this Thesis was the development of new analytical methodologies enabling the determination of some halogenated organic pollutants by using different MS techniques.

Firstly, a new analytical methodology for the determination of trihalomethanes (THMs) in drinking water was developed and validated. THMs are halogenated volatile organic compounds (HVOCs) formed as by-product when chlorine react with naturally occurring organic and inorganic matter in water. Toxicological studies have demonstrated that THMs are potential carcinogens, especially for long term exposure, so their determination in drinking water is of primary interest. The development of the new methodology required the optimization of GC-(ICP)MS working conditions. It was also necessary to check that the analytical response provided by this system was independent of the molecular structure of the analyte. Finally, the proposed methodology was applied to the determination of THMs in drinking water by compound independent calibration (CIC) with internal standard GC-(ICP)MS.

On the other hand, several methodologies for the determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental samples were developed and validated. PBDEs are included in the group of persistent organic pollutants (POPs) and have been widely used as flame retardants in polymeric materials constituting many products of regular use. However, PBDEs can easily release into the environment and bioaccumulate in living organisms. Findings that PBDEs are present at increasing levels in people have raised concerns about the potential risks of PBDE exposure to human health and the environment. Potential adverse effects linked to exposure to PBDEs have required an adequate control of these substances in biological and

ÍNDICE

A.	INTRODUCCIÓN.....	1
A.1	Contaminación ambiental por compuestos orgánicos halogenados	3
A.1.1	Compuestos orgánicos volátiles halogenados (HVOCs).....	6
A.1.1.1	Subproductos de desinfección. Trihalometanos (THMs)	6
A.1.1.2	Toxicidad de los THMs	9
A.1.1.3	Legislación de los THMs	11
A.1.2	Contaminantes orgánicos persistentes (POPs).....	13
A.1.2.1	Retardantes de llama. Difenil éteres polibromados (PBDEs).....	14
A.1.2.2	Toxicidad de los PBDEs.....	17
A.1.2.3	Legislación de los PBDEs	26
A.2	Métodos de análisis de contaminantes orgánicos halogenados	34
A.2.1	Métodos de preparación de muestra	34
A.2.1.1	Métodos de preparación de muestra para la determinación de THMs en matrices acuosas.....	35
A.2.1.2	Métodos de preparación de muestra para la determinación de PBDEs en muestras biológicas y medioambientales	45
A.2.1.2.1	Pretratamiento de muestra	46
A.2.1.2.2	Extracción de la muestra	47
A.2.1.2.3	Limpieza y fraccionamiento de los extractos	60
A.2.1.2.4	Extracción y limpieza simultáneas	63
A.2.2	Métodos de separación y detección.....	63
A.2.2.1	Métodos de separación y detección de THMs	63
A.2.2.1.1	Detector de captura electrónica (ECD).....	64
A.2.2.2	Métodos de separación y detección de PBDEs.....	65
A.2.2.2.1	Detector de captura electrónica (ECD).....	67
A.2.3	Métodos oficiales de análisis	67
A.2.3.1	Métodos oficiales para la determinación de THMs en aguas	68
A.2.3.2	Métodos oficiales para la determinación de PBDEs en muestras medioambientales	71
A.3	Detección de contaminantes orgánicos halogenados mediante espectrometría de masas	71
A.3.1	Fuentes de ionización	72
A.3.1.1	Ionización electrónica (EI).....	72

A.3.1.2	Ionización química negativa (NCI) o ionización negativa por captura de electrones (ECNI)	73
A.3.1.3	Plasma de acoplamiento inductivo (ICP).....	75
A.3.1.4	Fotoionización a presión atmosférica (APPI)	77
A.3.2	Analizadores de masas	77
A.3.2.1	Analizador de masas tipo cuadrupolo (Q).....	78
A.3.2.2	Trampa iónica de cuadrupolo (QIT)	79
A.3.2.3	Analizador de triple cuadrupolo (QqQ).....	80
A.3.2.4	Analizador de masas de alta resolución (HRMS)	81
A.3.3	Métodos de determinación y confirmación	82
A.3.3.1	Identificación y confirmación	82
A.3.3.2	Cuantificación	85
A.4	Bibliografía	88
B.	OBJETIVOS.....	115
C.	EXPERIMENTAL.....	119
C.1	Instrumentación.....	120
C.1.1	GC acoplado a (ICP)QMS.....	120
C.1.2	GC acoplado a (ICP)QMS con celda de colisión/reacción	123
C.1.3	GC-MS.....	124
C.1.4	HPLC-DAD	126
C.1.5	Otra instrumentación.....	126
C.2	Materiales y reactivos	127
C.2.1	Patrones, disolventes y material de vidrio.....	127
C.2.2	Muestras y materiales de referencia	129
C.3	Procedimientos	132
C.3.1	Procedimientos experimentales.....	132
C.3.1.1	Determinación de THMs en aguas de consumo humano.....	132
C.3.1.2	Síntesis de PBDEs marcados isotópicamente en ⁸¹ Br.....	133
C.3.1.3	Purificación de PBDEs marcados isotópicamente en ⁸¹ Br.....	134
C.3.1.4	Caracterización del patrón de PBDEs marcados en ⁸¹ Br	135
C.3.1.5	Determinación de PBDEs en muestras de pescado (SRM 1947 <i>Lake Michigan fish tissue</i>)	136
C.3.1.6	Determinación de PBDEs en muestras de agua de río.....	138
C.3.2	Procedimientos matemáticos	139

C.3.2.1	Calibrado independiente del compuesto (CIC)	139
C.3.2.2	Análisis por dilución isotópica	143
C.3.2.2.1	Análisis por dilución isotópica elemental	143
C.3.2.2.2	Análisis por dilución isotópica molecular	156
C.3.2.3	Cálculo de incertidumbres	174
C.3.2.3.1	Incertidumbre derivada del cálculo de la regresión lineal multivariable	177
C.3.2.3.2	Incertidumbre asociada las abundancias isotópicas teóricas	179
C.3.2.3.3	Incertidumbre derivada del cálculo de los factores de fragmentación	181
C.3.2.3.4	Estudios de propagación de errores	181
C.4	Referencias	183
D.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	187
D.1	Determinación de trihalometanos en aguas de consumo humano	189
D.1.1	Introducción	191
D.1.2	Objetivos	193
D.1.3	Resultados	194
D.1.3.1	Artículo científico I: <i>J. Anal. At. Spectrom.</i> 2007, 22, 1138–1144	194
D.1.4	Discusión de los resultados	201
D.1.4.1	Optimización de las condiciones de trabajo para la detección de cloro y bromo mediante el sistema GC-(ICP)MS	201
D.1.4.1.1	Optimización del flujo de gas portador y la potencia de radiofrecuencias	202
D.1.4.1.2	Optimización de la posición de la antorcha	204
D.1.4.1.3	Optimización del voltaje de las lentes iónicas	205
D.1.4.2	Optimización de las condiciones cromatográficas	205
D.1.4.3	Determinación de THMs mediante GC-(ICP)MS	208
D.1.4.4	Aplicabilidad de la metodología desarrollada según los requisitos de la normativa Europea	211
D.1.5	Referencias	214
D.2	Síntesis y caracterización de difenil éteres polibromados enriquecidos isotópicamente en bromo-81	217
D.2.1	Introducción	219
D.2.2	Objetivos	220

D.2.3	Resultados	221
D.2.3.1	Artículo científico II: <i>Anal. Chem.</i> , 2010, 82, 2879–2887	221
D.2.4	Discusión de los resultados.....	230
D.2.4.1	Optimización de las condiciones de la reacción de síntesis	230
D.2.4.2	Identificación de los compuestos sintetizados marcados isotópicamente en ⁸¹ Br	238
D.2.5	Referencias.....	241
D.3	Determinación de difenil éteres polibromados prioritarios en muestras de interés medioambiental mediante distintas metodologías de análisis por dilución isotópica.....	243
D.3.1	Introducción.....	245
D.3.2	Objetivos.....	246
D.3.3	Resultados	248
D.3.3.1	Artículo científico III: <i>J. Anal. Chem.</i> , 2011, 83, 3024–3032.....	248
D.3.3.2	Artículo científico IV: <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> , 2011, 401, 2639-2649	263
D.3.4	Discusión de los resultados.....	274
D.3.4.1	Comparación entre las metodologías desarrolladas para la determinación de PBDEs prioritarios	274
D.3.5	Referencias.....	282
E.	CONCLUSIONES	283
F.	SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS	289
G.	OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS.....	293
G.1	Determinación de incertidumbres en la distribución de isotopómeros de masa de moléculas.....	295

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los primeros compuestos orgánicos halogenados sintéticos	4
Figura 2. Procesos de bioacumulación y biomagnificación del DDT	6
Figura 3. Estructura general de los PBDEs donde $m + n$ está entre 1 y 10	15
Figura 4. Tendencia temporal en la concentración de PBDEs en leche materna de madres suecas	19
Figura 5. Hormonas tiroideas T_3 y T_4 y PBDEs hidroxilados equivalentes.....	22
Figura 6. Acción agonista y antagonista de los disruptores hormonales	23
Figura 7. Esquema de un sistema SDME	36
Figura 8. Esquema del procedimiento de DLLME	37
Figura 9. Esquema de un sistema HF-LPME	38
Figura 10. Perfiles isotópicos característicos de iones y fragmentos halogenados.....	83
Figura 11. Sistema GC-(ICP)QMS	120
Figura 12. Esquema del equipo (ICP)QMS (HP-4500, Agilent).....	121
Figura 13. Interfase utilizada para el acoplamiento GC-(ICP)MS	122
Figura 14. Sistema GC-(ICP)QMS con celda de colisión/reacción.....	123
Figura 15. Esquema del equipo (ICP)QMS con celda de colisión/reacción (Agilent 7500ec)..	124
Figura 16. GC-MS	125
Figura 17. Puntos de toma de muestra para la determinación de THMs en aguas potables ...	129
Figura 18. Puntos de toma de muestra para la determinación de PBDEs en agua de río.....	130
Figura 19. Esquema de síntesis para la obtención de patrones de PBDEs marcados isotópicamente en ^{81}Br	134
Figura 20. Fundamento del análisis por dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos	145
Figura 21. Curva de magnificación de error para los patrones marcados de PBDEs enriquecidos en ^{81}Br	154
Figura 22. Cálculo de fracciones molares mediante la función ESTIMACIÓN.LINEAL.....	164
Figura 23. Procedimiento de cálculo empleado para la obtención del perfil isotópico teórico de la molécula de metano	166
Figura 24. Macro de visual Basic para Excel desarrollado para el cálculo de perfiles isotópicos teóricos	167
Figura 25. Hoja de cálculo utilizada para el cálculo de perfiles isotópicos teóricos.....	168

Figura 26. Comparación de perfiles isotópicos teórico y experimental para BDE-28 (C ₁₂ H ₇ OBr ₃)	173
Figura 27. Hoja de cálculo modelo para realizar el cálculo de propagación de incertidumbres según Kragten	176
Figura 28. Hoja de cálculo para el cálculo de perfiles isotópicos teóricos y sus incertidumbres	180
Figura 29. Curva de propagación de error en IDA molecular.....	182
Figura 30. Esquema del sistema empleado para llevar a cabo la optimización de las condiciones del acoplamiento GC-(ICP)MS para la detección de cloro y bromo	202
Figura 31. Dependencia de la intensidad de la señal obtenida con el flujo de gas portador (mL min ⁻¹) y la potencia de radiofrecuencias para (a) Cl y (b) Br.....	203
Figura 32. Dependencia de la intensidad de la señal obtenida para el dímero de Ar con el flujo de gas portador (mL min ⁻¹) y la potencia de radiofrecuencias.....	204
Figura 33. Dependencia de la intensidad de la señal obtenida para Br con el potencial aplicado a la lente Extract 1	205
Figura 34. Cromatogramas obtenidos para la separación de THMs, CCl ₄ y patrón interno ...	207
Figura 35. Esquema del proceso de síntesis y cromatogramas obtenidos para las reacciones de síntesis de (a) CF y (b) BDCM.....	209
Figura 36. Mecanismo de la halogenación electrofílica aromática	230
Figura 37. Mecanismo de síntesis de PBDEs.....	230
Figura 38. Cromatogramas de los crudos de reacción obtenidos mediante GC-(ICP)MS para distintas condiciones de trabajo	232
Figura 39. Esquema de reacción de oxibromación con H ₂ O ₂	233
Figura 40. Cromatograma obtenido por GC-(ICP)MS para el crudo de la reacción de síntesis de oxibromación con H ₂ O ₂ como agente oxidante.....	234
Figura 41. Esquema de reacción de oxibromación con oxone	235
Figura 42. Cromatograma obtenido por GC-(EI)MS para el crudo de la reacción de síntesis de oxibromación con oxone como agente oxidante	236
Figura 43. Influencia de la relación Br ₂ /Ph ₂ O sobre el grado de bromación de los productos obtenidos mediante la reacción de halogenación en dos pasos con oxone como agente oxidante	238
Figura 44. Identificación de los compuestos sintetizados marcados isotópicamente por comparación de tiempos de retención	239

Figura 45. Confirmación del grado de bromación por comparación de datos teóricos y experimentales para el fragmento M^+ de un compuesto de fórmula molecular $C_{12}H_7OBr_3$	240
Figura 46. Espectros de masas obtenidos mediante GC-(EI)MS para el congénere BDE-47 ..	276
Figura 47. Ajuste de la señal obtenida para BDE-28+33 mediante mínimos cuadrados múltiples	279
Figura 48. Equipo de GC-MS y esquema de sus dos fuentes de ionización	280

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Tiempos de vida media del BDE-47 y BDE-99 en diferentes compartimentos medioambientales</i>	5
Tabla 2. <i>Estructura y propiedades fisicoquímicas de los THMs a 25 °C</i>	8
Tabla 3. <i>Clasificación de los THMs por su potencial carcinogenicidad según la IARC, ingesta diaria tolerable (TDI) recomendada por la WHO y valores límite para el contenido máximo en aguas de bebida establecidos por la USEPA, la Unión Europea y el Gobierno Español</i>	12
Tabla 4. <i>Propiedades fisicoquímicas de los PBDEs</i>	16
Tabla 5. <i>Composición de las mezclas comerciales de PBDEs</i>	17
Tabla 6. <i>Niveles genéricos de referencia (mg kg peso seco⁻¹) establecidos en el RD 9/2005 para los PBDEs</i>	29
Tabla 7. <i>Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que se basan en técnicas de LLE para la preparación de la muestra</i>	38
Tabla 8. <i>Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que se basan en la técnica de HS para la preparación de muestra</i>	40
Tabla 9. <i>Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que se basan en la técnica de PT para la preparación de muestra</i>	41
Tabla 10. <i>Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que se basan en la técnica de SPME para la preparación de muestra</i>	43
Tabla 11. <i>Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos con DAI de la muestra</i>	44
Tabla 12. <i>Técnicas de monitorización de THMs en línea</i>	45
Tabla 13. <i>Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que se basan en técnicas de LLE para la preparación de la muestra</i>	48
Tabla 14. <i>Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs mediante distintos métodos de SPE para la preparación de muestras líquidas</i>	50
Tabla 15. <i>Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs mediante distintos métodos de SPME y SBSE para la preparación de muestras líquidas</i>	51
Tabla 16. <i>Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs mediante SLE para la preparación de muestras sólidas</i>	52
Tabla 17. <i>Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs mediante SE para la preparación de muestras sólidas</i>	53

Tabla 18. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs empleando PLE para la extracción de los analitos en muestras sólidas.....	55
Tabla 19. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs empleando MAE para la extracción de los analitos en muestras sólidas.....	57
Tabla 20. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs empleando UAE para la extracción de los analitos en muestras sólidas.....	58
Tabla 21. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs empleando MSPD para la extracción de los analitos en muestras sólidas.....	59
Tabla 22. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs empleando SPME para la extracción de los analitos en muestras sólidas.....	59
Tabla 23. Composición y polaridad de las fases estacionarias más utilizadas para la separación de THMs por GC.....	64
Tabla 24. Iones seleccionados para la detección y medida de THMs.....	73
Tabla 25. Potenciales de ionización y grados de ionización de algunos elementos en un plasma ICP.....	76
Tabla 26. Valores certificados para los THMs en el material de referencia SRM 1639.....	131
Tabla 27. Valores certificados para los PBDEs en el material de referencia SRM 2257.....	131
Tabla 28. Valores certificados para los PBDEs en el material de referencia SRM 1947.....	132
Tabla 29. Concentración de ⁸¹ Br-PBDEs añadida a las muestras de SRM 1947.....	137
Tabla 30. Concentración de ⁸¹ Br-PBDEs añadida a las muestras de agua de río.....	139
Tabla 31. Condiciones de trabajo del sistema GC-(ICP)MS para la determinación de THMs en aguas.....	142
Tabla 32. Condiciones de trabajo del sistema GC-(ICP)MS para su aplicación a IDA elemental.....	155
Tabla 33. Condiciones de trabajo del sistema GC-(NCI)MS para su aplicación a IDA elemental.....	156
Tabla 34. Distribución de isotómeros de masa para CH ₄	161
Tabla 35. Condiciones de medida seleccionadas para el estudio de los factores de fragmentación de los PBDEs.....	172
Tabla 36. Condiciones de trabajo del sistema GC-(EI)MS para su aplicación a IDA molecular.....	174
Tabla 37. Principales interferencias por formación de iones moleculares que pueden presentar Cl y Br para cada uno de sus isótopos, resolución necesaria para separarlas y gases empleados en la celda de colisión y reacción.....	192

Tabla 38. Condiciones cromatográficas para la separación de los trihalometanos y el patrón interno mediante las columnas HP5 y DB-VRX.....	206
Tabla 39. Tiempo de retención (t_R) y anchura de pico al 50% de su altura ($w_{1/2}$) para los THMs, tetracloruro de carbono y patrón interno en las condiciones cromatográficas óptimas	208
Tabla 40. Condiciones de trabajo ensayadas para la obtención de PBDEs mediante una reacción de oxibromación con H_2O_2	233
Tabla 41. Condiciones de trabajo ensayadas para la obtención de PBDEs mediante una reacción de oxibromación con oxone.....	236
Tabla 42. Comparación de las características de las principales técnicas de MS utilizadas para la determinación de PBDEs	279

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AED	Detector de emisión atómica
AhR	Receptor de dioxinas
AMAP	Programas de Monitoreo y Evaluación del Ártico
APHA	Asociación Americana de Salud Pública
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
AR	Receptores androgénicos
AWWA	Asociación Americana de Obras Sanitarias
BDCM	Bromodichlorometano
BF	Bromoformo
BFR(s)	Retardante(s) de llama bromado(s)
CAS RN	Número de registro del servicio de resúmenes químicos
CEN	Comité Europeo de Normalización
CF	Cloroformo
CIC	Calibrado independiente del compuesto
CLRTAP	Convenio sobre la Contaminación del Aire Transfronteriza de Largo Alcance
CMS	Muestreador capilar de membrana
CPE-UABE	Extracción por punto de nube asistida por ultrasonidos
DAD	Detector de diodos en serie
DAI	Inyección acuosa directa
DBCM	Dibromoclorometano
DBP(s)	Subproducto(s) de desinfección
DDT	1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano
DeBDE	Decabromodifenil éter
DELCD	Detector de conductividad electrolítica seca
DHHS	Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos
DI-SPME	Microextracción en fase sólida en modo de inmersión directa
DiBDE(s)	Dibromodifenil éter(es)
DLCs	Compuestos "Dioxin-like"
DLLME	Microextracción líquida dispersiva
DSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
ECD	Detector de captura electrónica

ECHA	Agencia Europea de Productos Químicos
ECNI	Ionización química por captura de electrones
EI	Impacto electrónico
EPA	Agencia de Protección Medioambiental
EQS	Normas de calidad ambiental
ER	Receptores estrogénicos
EU	Unión Europea
FR(s)	Retardante(s) de llama
GC	Cromatografía de Gases
GEC	Celda de extracción de gas
GPC	Cromatografía por permeabilidad en gel
HAA(s)	Ácido(s) haloacético(s)
HAN(s)	Haloacetoniitrilo(s)
HBCD	Hexabromociclododecano
HCB	Hexaclorobenceno
HCH	Hexaclorociclohexano
HF-LPME	Microextracción en fase líquida con membrana de fibra hueca
HK(s)	Halocetona(s)
hotSE	Soxhlet caliente
HpBDE(s)	Heptabromodifenil éter(es)
HPLC	Cromatografía Líquida de alta resolución
HRGC	Cromatografía de Gases de alta resolución
HRMS	Espectrometría de Masas de alta resolución
HS	Espacio de cabeza estático
HS-SPME	Microextracción en fase sólida en el modo de espacio de cabeza
HVOC(s)	Compuesto(s) orgánico(s) volátil(es) halogenado(s)
HxBDE(s)	Hexabromodifenil éter(es)
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
ID	Dilución isotópica
IDL	Intervalo dinámico lineal
IPD	Deconvolución de perfiles isotópicos
LC	Cromatografía Líquida
LD(s)	Límite(s) de detección
LD ₅₀	Dosis letal para el 50% de una población

LD-LVI	Desorción líquida con inyector de grandes volúmenes
LLE	Extracción líquido-líquido
LPME	Microextracción en fase líquida
MAE	Extracción asistida por microondas
MBDE(s)	Monobromodifenil éter(es)
MCL	Nivel máximo de contaminante
MeTBBPA	Dimetil tetrabromobisfenol A
MS	Espectrometría de Masas
MSD	Detector de Espectrometría de Masas
MTBE	Metil- <i>tert</i> -butiléter
MWCNTs	Nanotubos de carbono multipared
NBDE(s)	Nonabromodifenil éter(es)
NCI	Ionización química negativa
OBDE(s)	Octabromodifenil éter(es)
ORS	Sistema de octapolo de reacción
OSPAR	Oslo-París (Convenio)
PA	Poliacrilato
PANI	Polianilina
PBB(s)	Bifenilo(s) polibromado(s)
PBDE(s)	Difenil éter(es) polibromado(s)
PCB(s)	Bifenilo(s) policlorado(s)
PCDDs	Policlorodibenzodioxinas
PCDE(s)	Difenil éter(es) policlorado(s)
PCDFs	Policlorodibenzofuranos
PCN(s)	Naftaleno(s) policlorado(s)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDPID	Detector de fotoionización de descarga pulsada
PeBDE(s)	Pentabromodifenil éter(es)
PFOS	Ácido perfluorooctanosulfónico
PFTBA	Perfluorotributilamina
PID	Detector de fotoionización
PLE	Extracción con líquidos presurizados
PM- β -CD	β -ciclodextrina permetilada
POP(s)	Contaminante(s) orgánico(s) persistente(s)

POPRC	Comité de Revisión de Contaminantes Orgánicos Persistentes
PR	Receptores progestagénicos
PRTRs	Registro de emisiones y transferencias de contaminantes
PT	Purga y trampa
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflón)
PTV	Vaporizador de temperatura programada
REACH	Registro, Evaluación y Autorización de Sustancias y Preparados Químicos
RoHS	Restricción de Sustancias Peligrosas (Directiva)
RSD(s)	Desviación(es) estándar relativa(s)
SBSE	Extracción sortiva con barra de agitación
SCMS	Muestreador capilar de membrana sobre un soporte
SDME	Microextracción en gota
SDWA	Ley de Agua de Consumo Segura
SE	Extracción Soxhlet
SEM	Multiplicador de electrones secundarios
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SLE	Extracción sólido-líquido
SMC	Comité de Métodos Estándar
SME	Microextracción con disolventes
SPE	Extracción en fase sólida
SPLE	Extracción selectiva con líquidos presurizados
SPME	Microextracción en fase sólida
SWCNTs	Nanotubos de carbono monopared
T ₃	Triyodotironina
T ₄	Tiroxina o tetrayodotironina
TBBPA	Tetrabromobisfenol A
TeBDE(s)	Tetrabromodifenil éter(es)
TBG	Globulina fijadora de tiroxina
TD	Desorción térmica
TH	Hormona tiroidea
THM(s)	Trihalometano(s)
THR _s	Receptores de la hormona tiroidea
TrBDE(s)	Tribromodifenil éter(es)

TSCA	Ley de control de Sustancias Tóxicas
TSO-OH	Aceite de silicona con grupos hidroxilo terminales
TTHMs	Contenido total de trihalometanos
TTR	Transtiretina
UAE	Extracción asistida por ultrasonidos
UDGPT	Enzima uridin-difosfato-glucuronil transferasa
USAEME	Microextracción en fase líquida mediante emulsión asistida por ultrasonidos
USEPA	Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos
UNEP	Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente
UNECE	Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa
VOCs	Compuestos orgánicos volátiles
WEEE	Residuos de Aparatos Eléctricos y Electrónicos (Directiva)
WEF	Federación del Medioambiente del Agua
WFD	Directiva Marco del Agua
WHO	Organización Mundial de la Salud

A. INTRODUCCIÓN

A.1 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR COMPUESTOS ORGÁNICOS HALOGENADOS

Desde mediados del siglo XVIII la industria química ha fabricado gran variedad de nuevos productos que han ayudado a cubrir muchas de las necesidades del ser humano. El empleo de estas nuevas sustancias ha aportado mejoras significativas en muchos aspectos de la vida y contribuido en gran medida al desarrollo y progreso tecnológico de la humanidad. Sin embargo, estas sustancias se emplearon durante mucho tiempo sin tener en cuenta las consecuencias que podía tener su incorporación, o la de sus derivados, en el medioambiente ni los efectos adversos que podían causar sobre los seres vivos y su entorno.

El problema de la contaminación ambiental comenzó a acentuarse a partir del siglo XIX, entre otras causas, como consecuencia indirecta del desarrollo de la química orgánica que permitió la síntesis de una gran variedad de nuevos compuestos químicos, comenzando muchos de ellos a fabricarse a nivel industrial. Desafortunadamente, una gran cantidad de residuos de los procesos de fabricación y/o subproductos procedentes de la aplicación de los nuevos compuestos en diversas actividades humanas se dispersaron indiscriminadamente en el medioambiente, a pesar de desconocer su toxicidad y sus posibles efectos a medio y largo plazo.

Los compuestos orgánicos halogenados fueron unos de los productos de síntesis que causaron mayor impacto ambiental. Los primeros en ser sintetizados fueron los compuestos organoclorados. Su producción y uso intensivo se inició alrededor de los años 30 y pronto se hicieron populares por sus propiedades como plaguicidas y aislantes. En la *Figura 1* se muestra la estructura química de los primeros compuestos organohalogenados que se sintetizaron industrialmente junto con su aplicación.

La mayoría de estos compuestos orgánicos halogenados resultaron eficaces, baratos y fáciles de usar, aumentando notablemente con el tiempo el número de compuestos análogos sintetizados para los que se encontraron nuevas aplicaciones como disolventes, refrigerantes, propelentes de aerosoles, espumantes, sustancias para extinguir incendios y materia prima para polímeros, insecticidas y herbicidas.

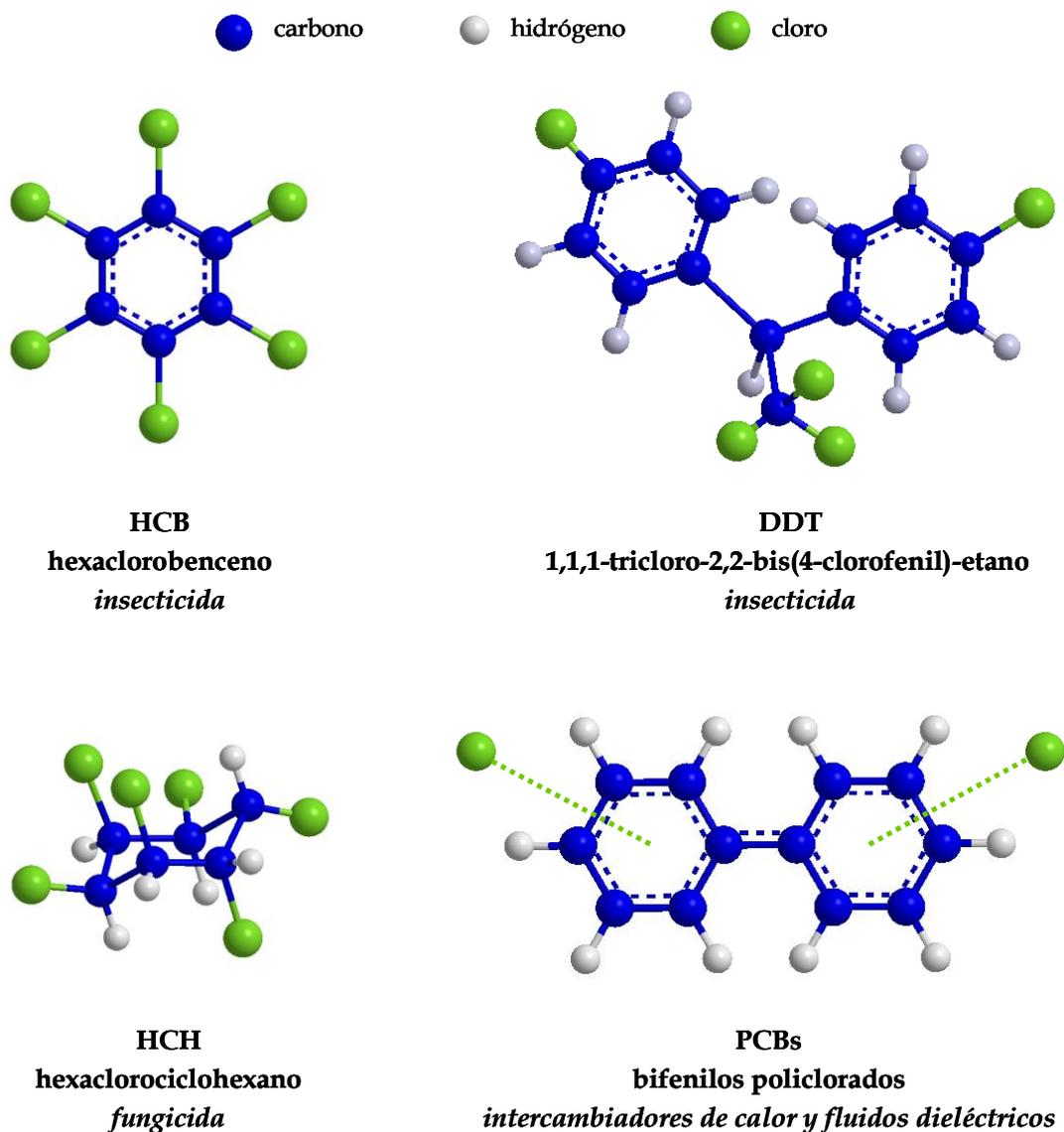


Figura 1. Estructura de los primeros compuestos orgánicos halogenados sintéticos

Sin embargo, con el paso del tiempo se empezó a observar que el uso de estos compuestos provocaba algunos efectos adversos en los seres vivos que habitaban zonas próximas a los lugares donde eran fabricados o empleados. A raíz de estos hechos, se comenzaron a llevar a cabo estudios toxicológicos que demostraron que muchos de los compuestos orgánicos halogenados están relacionados con problemas hepáticos, reproductivos e inmunológicos así como con alteraciones neurológicas y del desarrollo, disrupción hormonal y ciertos tipos de cáncer. La toxicidad que presentan depende del tipo de sustancia y del grado y duración de la exposición a la misma, pero además se debe tener en cuenta que la exposición simultánea a varias de estas sustancias puede

provocar, en algunos casos, efectos adversos superiores a los que corresponderían a la suma de sus respectivos efectos individuales.

Por otro lado, una buena parte de los compuestos orgánicos halogenados y/o sus derivados presentan gran estabilidad, por lo que son resistentes a los procesos de degradación química, biológica y fotolítica. Esto significa que estas sustancias persisten en el medioambiente durante largos periodos de tiempo, pudiendo además ser transportadas a zonas alejadas del lugar donde se emplearon y dispersarse por todo el planeta. La *Tabla 1* muestra los tiempos de vida medios de algunos compuestos clasificados como persistentes en diferentes compartimentos medioambientales.

Tabla 1. *Tiempos de vida media del BDE-47 y BDE-99 en diferentes compartimentos medioambientales*

Compartimento medioambiental	Tiempo de vida media estimado (días)	
	BDE-47	BDE-99
Aire	11	15
Agua	150	150
Suelo	150	150
Sedimento aeróbico	600	600

Otro de los problemas que presentan los compuestos orgánicos halogenados, junto con su toxicidad y persistencia, es su tendencia a bioacumularse dentro de los organismos vivos. En general, son sustancias poco solubles en agua y presentan gran lipofiliidad, de forma que, con facilidad, alcanzan concentraciones más elevadas dentro de los organismos vivos que en el entorno que los rodea. Debido a que se trata de sustancias de origen antropogénico, los seres vivos no son capaces de metabolizarlas y por ello tienden a acumularse y preconcentrarse en los tejidos grasos. Además, las sustancias bioacumulativas presentan también tendencia a biomagnificarse, es decir, los microorganismos absorben las sustancias tóxicas del agua y los sedimentos y cuando los organismos superiores se alimentan de ellos las sustancias acumuladas van pasando de unos a otros, alcanzándose concentraciones crecientes a medida que se avanza en el nivel trófico en la cadena alimenticia. En la *Figura 2* se puede ver un ejemplo de los procesos de bioacumulación y biomagnificación del DDT, sustancia que se utilizó ampliamente como plaguicida durante el siglo pasado.

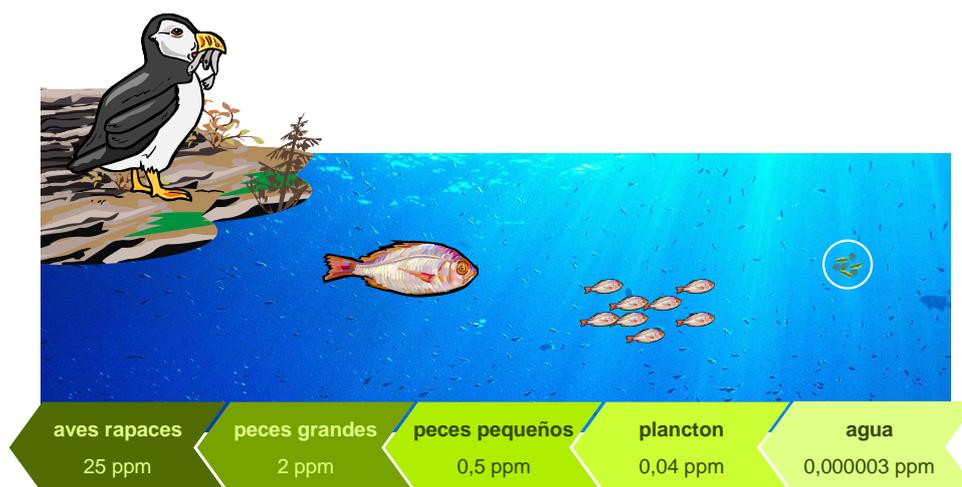


Figura 2. *Procesos de bioacumulación y biomagnificación del DDT*

Por todo ello distintas instituciones dedicadas a la conservación del medioambiente han ido tomando medidas para el control y la prevención de la contaminación por compuestos orgánicos halogenados hasta el punto de que muchos de ellos están actualmente prohibidos. Sin embargo, debido a su lenta biodegradación y a que aun continúan usándose en muchos países del tercer mundo, muchas de estas sustancias todavía siguen estando presentes en los distintos compartimentos medioambientales.

A.1.1 Compuestos orgánicos volátiles halogenados (HVOCs)

Los compuestos orgánicos volátiles halogenados (HVOCs) son sustancias orgánicas que presentan una presión de vapor igual o superior a 10 Pa a 20 °C y que contienen al menos un átomo de un elemento halógeno (F, Cl, Br, I) en su molécula.¹ Los HVOCs se emplean comúnmente como disolventes, desengrasantes, agentes para la limpieza en seco, propelentes de aerosoles y refrigerantes. Hoy en día, algunos de los HVOCs son considerados contaminantes orgánicos prioritarios debido a que su presencia en suelos, sedimentos, aguas y atmósfera está ampliamente extendida y a que, incluso a bajas concentraciones, son considerados tóxicos, carcinogénicos o mutagénicos.^{2,3}

A.1.1.1 Subproductos de desinfección. Trihalometanos (THMs)

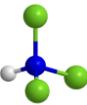
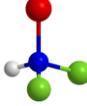
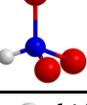
A principios del siglo XX las naciones desarrolladas comenzaron a llevar a cabo procesos de desinfección de los suministros de agua potable a través de la cloración. Este paso supuso una importante reducción en la propagación de enfermedades debidas a la presencia de microorganismos patógenos en el agua proporcionando

además una mejora en sus características organolépticas. Por todo ello, la desinfección con cloro de los suministros de agua pública se consideró uno de los mayores logros del siglo XX en el campo de la salud pública, su empleo nunca ha sido discutido y aún se sigue utilizando en la actualidad.⁴

Sin embargo, el cloro, además de ser un eficaz desinfectante, es una sustancia que reacciona con facilidad con la materia orgánica y los bromuros presentes de forma natural en el agua dando lugar a ciertas sustancias químicas orgánicas e inorgánicas denominadas subproductos de desinfección (DBPs).

La presencia de DBPs en el agua clorada fue puesta de manifiesto a mediados de los años 70 por algunos investigadores como Rook⁵ en Holanda y Bellar⁶ en Estados Unidos mediante el empleo de la Cromatografía de Gases (GC) y la Espectrometría de Masas (MS). Como consecuencia de estos resultados, en 1975 la USEPA (United States Environmental Protection Agency) tomó cartas en el asunto analizando aguas tratadas en cinco grandes ciudades. Se identificaron 72 compuestos de los que el 53% contenía uno o más halógenos. Posteriormente se hizo un estudio más extenso, abarcando 113 ciudades de forma que a finales de 1976 la EPA publicó una lista con 1259 compuestos identificados en distintas aguas naturales, tanto en Estados Unidos como en Europa. Este estudio concluyó que todos los sistemas de abastecimiento que utilizaban cloro libre en su tratamiento, contenían al menos cuatro trihalometanos (CHCl_3 , CHBrCl_2 , CHBr_2Cl y CHBr_3).⁷ En la *Tabla 2* se muestran las estructuras y las propiedades fisicoquímicas de los THMs.

Tabla 2. Estructura y propiedades fisicoquímicas de los THMs a 25 °C⁸

Compuesto		Peso molecular	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (mg · L ⁻¹)	log K _{ow}	Presión de vapor (mm Hg)
CF		119,38	61,18	7,95×10 ³	1.97	1,97×10 ²
BDCM		163,83	87	1,29×10 ³	2	5×10 ¹
DBCM		208,29	134	2,7×10 ³	2.16	5,54
BF		252,75	149,21	3,1×10 ³	2,40	5,4


● carbono ● hidrógeno ● cloro ● bromo

El proceso de cloración consiste en aplicar a las aguas que llegan a la planta de tratamiento, cloro libre, hipoclorito sódico u otros desinfectantes químicos en exceso. Mediante este exceso de desinfectante se logra oxidar los agentes reductores que contiene el agua (compuestos orgánicos e inorgánicos como nitritos, iones de hierro, plomo y sulfuros) y eliminar microorganismos y bacterias. Además, el cloro residual que queda en los conductos continúa desinfectando el agua hasta que llega al consumidor. Cuando ese exceso de desinfectante es muy elevado puede reaccionar también con la materia orgánica y los bromuros presentes en el agua dando lugar a la formación de DBPs.⁹

El mecanismo de formación de los DBPs no está demasiado claro debido a la escasa información acerca de la estructura química de la materia orgánica natural presente en las aguas. Sin embargo sí se sabe que los factores que afectan a su formación son la dosis de desinfectante aplicada, el tiempo de contacto, la temperatura, el pH y la concentración de bromuros y materia orgánica en el agua.^{10,11}

Si las dosis de cloro aplicadas en el proceso de desinfección son elevadas la formación de subproductos orgánicos clorados aumenta. El tiempo de contacto va a influir en el tipo de subproductos de desinfección producidos. La formación de THMs y ácidos haloacéticos (HAAs) es mayor para tiempos de contacto largos mientras que los

haloacetnitrilos (HANs) y las halocetonas (HKs) desaparecen debido a reacciones de hidrólisis entre estos compuestos y el cloro residual. Temperaturas elevadas favorecen que las reacciones tengan lugar más rápidamente dando lugar a un rendimiento de formación de subproductos clorados superior. Además favorece la descomposición de HANs y HKs. El pH también influye en el tipo de subproductos generados, de modo que a pH elevados disminuye la formación de HKs mientras que se incrementa la de THMs y ácidos HAAs y viceversa. La cantidad y naturaleza de la materia orgánica presente en el agua influye en gran medida en el tipo y concentración de subproductos formados. Cuanto más alta es la concentración de materia orgánica disuelta en el agua más cantidad de THMs se forma. Por tanto, las aguas superficiales cloradas presentan niveles más elevados de THMs que las aguas subterráneas cloradas. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en las épocas más calurosas del año la concentración de materia orgánica disuelta también es mayor por lo que la concentración de THMs también será más alta que en las épocas más frías. Finalmente, concentraciones elevadas de bromuro en el agua implica una mayor formación de subproductos bromados.¹²

En los suministros de agua potable los DBPs más comunes son los THMs. El más abundante de los THMs es el CF, que se forma por la reacción del cloro libre añadido a las aguas para su desinfección con la materia orgánica natural. El siguiente en abundancia es el BDCM, que se genera por la reacción de bromuro presente en las aguas con el cloroformo formado previamente. Sucesivas reacciones de bromación van a dar lugar al resto de los THMs los cuales se encuentran ya a niveles más bajos.

A.1.1.2 Toxicidad de los THMs

A pesar de que existen estudios que indican que los THMs no son tan críticos para el medioambiente en términos de toxicidad, persistencia y bioacumulación, como otros compuestos orgánicos clorados procedentes del proceso de cloración de las aguas o el propio cloro residual,¹³ según ciertos estudios toxicológicos, la exposición continuada a estos compuestos produce, en la mayoría de los casos, efectos adversos sobre la salud. Por tanto, es muy importante que el exceso de desinfectante se mantenga dentro de unos niveles seguros, ya que niveles demasiado elevados generarían una mayor cantidad de THMs.

Los mamíferos generalmente absorben, metabolizan y eliminan rápidamente los THMs tras la exposición por vía oral, dérmica o por inhalación.

El CF es absorbido con facilidad a través de la piel tanto en animales como en seres humanos y existen estudios que demuestran que el CF se absorbe a través de la piel durante la ducha.¹⁴ Una vez dentro del organismo el CF se distribuye por todo el cuerpo. Los niveles más altos se encuentran en los tejidos grasos, sangre, hígado, riñones, pulmones y sistema nervioso. La distribución depende de la ruta de exposición. Así, los tejidos extrahepáticos reciben mayores dosis de cloroformo cuando la exposición es dérmica o por inhalación que cuando se ingiere. También se ha demostrado que el CF se puede transferir al feto a través de la placenta en varias especies animales y en humanos.¹⁴ El CF no metabolizado se acumula preferentemente en los tejidos grasos.

Los THMs bromados son más lipofílicos que el CF, aumentando esta propiedad a medida que aumenta el número de átomos de bromo, lo que va a afectar a su solubilidad en los distintos tejidos. Los niveles más altos de BF se encuentran principalmente en el hígado, estómago y riñones.

Los THMs se metabolizan transformándose principalmente en dióxido de carbono (CO₂) y/o monóxido de carbono (CO). El metabolismo del CF puede tener lugar tanto por oxidación como por reducción. Algunos datos indican que la toxicidad del CF se debe principalmente a sus metabolitos. El metabolismo del CF por vía oxidativa da lugar a la formación de fosgeno y cloruro de hidrógeno, que pueden causar lesiones en los tejidos y muerte celular. Las rutas metabólicas reductivas dan lugar a la formación de radicales libres e intermedios mutagénicos.

El BDCM se metaboliza dando fosgeno, mientras que el DBCM y el BF producen análogos bromados del fosgeno. Según ciertos estudios, el metabolismo de los THMs bromados no sigue la misma ruta que los clorados y son activados por distintos mecanismos, por lo que presentan distinta mutagenicidad. Los compuestos bromados son más mutagénicos que los que no contienen bromo. El potencial mutagénico relativo sigue el siguiente orden: BF = DBCM > BDCM.

La exposición a varios THMs simultáneamente puede producir otros efectos adversos. Así, existen estudios que evidencian que el CF es metabolizado en menor proporción cuando se administra junto con algún THM bromado y que el BF y el DBCM persisten

en la sangre y en los tejidos por periodos más largos de tiempo cuando se coadministran con el CF.¹⁴

La eliminación de los THMs se produce principalmente por vía respiratoria, mientras que la eliminación urinaria y fecal es de menor importancia. Los THMs se pueden eliminar como tales o tras haber sido metabolizados a CO₂.

La IARC (International Agency for Research on Cancer) clasifica los trihalometanos como posibles carcinógenos^{15,16} (*Tabla 3*) y además, según ciertos estudios, los THMs con dos y tres átomos de bromo en su molécula son más mutagénicos que el resto, especialmente el DBCM. Algunos estudios realizados han encontrado un ligero aumento en los casos de cáncer de colon y vejiga en áreas donde el agua de bebida era clorada.¹⁷ Otros estudios muestran que existe una relación entre la presencia de CF en las aguas de consumo humano y los bajos pesos de los recién nacidos, aumento de los nacimientos prematuros y retardos en el crecimiento intrauterino.¹⁸ Investigaciones con animales han demostrado que existe una relación entre la exposición a THMs y casos de fetotoxicidad y anormalidades en el esperma.^{19,20}

A.1.1.3 Legislación de los THMs

Puesto que cada vez existen más estudios que relacionan la exposición continuada a THMs con ciertos efectos adversos en los seres vivos, ha sido necesario fijar unos valores máximos permitidos para el contenido total de estas sustancias en aguas de consumo humano. Así, en 1979 la USEPA definió niveles máximos de contaminante (MCL) para ciertas sustancias, entre ellas los THMs. En un principio se estableció un MCL de 100 µg·L⁻¹ para TTHMs, (considerándose TTHMs, como la suma de las concentraciones de los cuatro THMs que pueden estar presentes en las aguas cloradas) en aquellos sistemas públicos de abastecimiento de agua que sirvieran al menos a 10000 personas. En el año 1998 se redujo este valor a 80 µg·L⁻¹ (*Tabla 3*) tras haber llevado a cabo nuevos estudios sobre los efectos que podía provocar la exposición a los THMs.²¹

Tabla 3. Clasificación de los THMs por su potencial carcinogenicidad según la IARC,^{15,16} ingesta diaria tolerable (TDI) recomendada por la WHO¹⁴ y valores límite para el contenido máximo en aguas de bebida establecidos por la USEPA,²¹ la Unión Europea²² y el Gobierno Español²³

Compuesto	Potencial carcinogénico (IARC)	TDI según WHO (µg · L ⁻¹)	Valores límite permitidos en agua de bebida según diferentes legislaciones		
			USEPA (µg · L ⁻¹)	Directiva 98/83/EC (µg · L ⁻¹)	RD 140/2003 (µg · L ⁻¹)
CF	2B	300-150	ΣTHMs ≤ 100 hasta 2001	ΣTHMs ≤ 150 hasta 2008	ΣTHMs ≤ 150 hasta 2008
BDCM	2B	60-30			
DBCM	3	100	ΣTHMs ≤ 80 a partir de 2002	ΣTHMs ≤ 100 a partir de 2009	ΣTHMs ≤ 100 a partir de 2009
BF	3	100			

Grupo 2B: posible carcinógeno para seres humanos; Grupo 3: no clasificable en función de su carcinogenicidad para seres humanos.

Por su parte la WHO (World Health Organization) estableció en 1993 unos valores de referencia para el contenido de cada una de estas especies en el agua (Tabla 3). Además, teniendo en cuenta los efectos que puede provocar sobre la salud el hecho de estar expuesto a varios de estos compuestos simultáneamente, dio una referencia adicional (Ecuación 1) que indica que la suma de las concentraciones de cada THM entre su valor de referencia correspondiente debe ser inferior a la unidad.¹⁴

$$\frac{C_{CF}}{VR_{CF}} + \frac{C_{BDCM}}{VR_{BDCM}} + \frac{C_{DBCM}}{VR_{DBCM}} + \frac{C_{BF}}{VR_{BF}} \leq 1,0 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

C: concentración de compuesto, VR: valor de referencia establecido por la WHO

Por otro lado, en el año 2000 se publicó la Directiva Europea denominada Directiva Marco del Agua (WFD)²⁴ por la que se estableció la necesidad de definir una serie de sustancias prioritarias consideradas como contaminantes peligrosos en aguas continentales. En el año 2001 se definieron un total de 33 sustancias o grupos de sustancias prioritarias²⁵ dentro de las cuales se incluyó el CF. Por otro lado en 1998 la Comisión Europea publicó una Directiva sobre la calidad del agua destinada al

consumo humano²² de la que deriva el Real Decreto 140/2003²³, que limita el nivel de THMs a 100 µg/L⁻¹ (Tabla 3).

Por tanto, el control de estas sustancias es de obligado cumplimiento por los organismos competentes. Todos los laboratorios que se dediquen al control medioambiental debe determinar estas sustancias periódicamente en un gran número de muestras, especialmente en aguas potables y continentales y aunque la legislación actual sólo limita el contenido máximo de TTHMs, los laboratorios van a tener que desarrollar métodos para la cuantificación de los THMs individuales teniendo en cuenta que no todas las especies presentan la misma toxicidad.

A.1.2 Contaminantes orgánicos persistentes (POPs)

Los contaminantes orgánicos persistentes (POPs) son compuestos orgánicos altamente resistentes a la degradación química, biológica y fotolítica.²⁶ En la mayoría de los casos, los POPs son compuestos orgánicos aromáticos halogenados semivolátiles por lo que pueden pasar a la atmósfera con relativa facilidad en zonas de clima cálido, ser transportados a largas distancias del lugar donde han sido utilizados y condensar en zonas más frías, dispersándose así por todo el planeta. Por tanto, todos los seres humanos estamos expuestos de forma constante a una serie de sustancias clasificadas como POPs tanto a través del ambiente que nos rodea como de la dieta.

Una de las principales características que presentan los POPs es su baja solubilidad en agua y su alta lipofilidad. Esto va a favorecer la bioacumulación de estas sustancias en los tejidos grasos de los seres vivos y su biomagnificación a lo largo de la cadena trófica.

En cuanto a su toxicidad, existen estudios que demuestran que la exposición crónica a POPs, incluso a bajos niveles de concentración, puede provocar efectos adversos sobre gran variedad de especies y en prácticamente todos los niveles de la cadena trófica.

Teniendo en cuenta el riesgo que suponen los POPs para los seres vivos, en 2005 distintos gobiernos del mundo se reunieron en Estocolmo con el fin de tomar medidas para proteger la salud humana y el medioambiente de los daños provocados por estas sustancias. El resultado de esta reunión fue un convenio conocido como Convenio de Estocolmo, que ha sido respaldado por el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP) y en el que se regula el tratamiento de varias sustancias tóxicas. En

el Convenio de Estocolmo se identificaron inicialmente doce sustancias prioritarias, conocidas como la “Docena Sucia” (aldrín, clordano, DDT, dieldrín, endrín, heptacloro, hexaclorobenceno, mirex, toxafeno, PCBs, dioxinas y furanos policlorados), pero en 2009 se amplió esta lista incluyéndose otras nueve sustancias conocidas como “nuevos POPs” (clordecona, hexabromobifenilo, hexa y heptabromodifenil éter, α y β -hexaclorociclohexano, lindano, pentaclorobenceno, ácido perfluorooctanosulfónico, sus sales y fluoruro de perfluorooctanosulfonato y tetra y pentabromodifenil éter). El Convenio de Estocolmo pretende que los países miembros restrinjan el uso y producción de estas sustancias hasta su completa eliminación.

A.1.2.1 Retardantes de llama. Difenil éteres polibromados (PBDEs)

Los retardantes de llama (FRs) son sustancias químicas que se incorporan en el proceso de fabricación de ciertos productos poliméricos como plásticos, textiles y espumas que posteriormente se emplean como materia prima en la fabricación de gran cantidad de muebles y aparatos electrónicos de uso cotidiano.²⁷ Estos compuestos interfieren con el proceso de combustión de los materiales poliméricos a los que se incorporan ya que en presencia de calor se descomponen antes que la matriz del polímero que los contiene, previniendo la formación de gases inflamables y reduciendo o limitando el riesgo de que se propague el fuego en caso de incendio.²⁸

Los FRs se pueden incorporar a los materiales poliméricos como reactivos o como aditivos. Cuando se incorporan como reactivos se unen covalentemente al polímero, mientras que, si se incorporan como aditivo lo que ocurre es que quedan disueltos y por tanto no estarán tan fuertemente enlazados a la matriz y pueden liberarse al entorno con mayor facilidad.²⁸

Si bien existen distintos tipos de FRs, los retardantes de llama bromados (BFRs) son de los más utilizados al ser los más baratos y resultar muy eficaces.²⁸ Dentro del grupo de los BFRs destacan los difenil éteres polibromados (PBDEs) que son una familia de compuestos cuya estructura consiste en dos grupos fenilo unidos por un átomo oxígeno que pueden tener entre 1 y 10 átomos de Br unidos a las distintas posiciones de los anillos aromáticos dando lugar a un total de 209 congéneres teóricos.²⁹ Cada uno de estos congéneres se nombra, según la nomenclatura IUPAC, mediante un indicador numérico que va de 0 a 209 de forma semejante a los PCBs^{30,31} tras las siglas BDE. Atendiendo al número de átomos de bromo presentes en la molécula se pueden

distinguir diez grupos homólogos (mono-, di-, tri-, tetra-, penta-, hexa-, hepta-, octa-, nona- y decabromo difenil éter). Cada uno de estos grupos puede estar formado por uno o más isómeros o congéneres. El grupo mono- está formado por un total de 3 congéneres numerados del 1 al 3 según la nomenclatura IUPAC, el grupo di- por 12 congéneres (4 - 15), el tri- 24 (16 - 39), el tetra- 42 (40 - 81), el penta- 46 (82 - 127), el hexa- 42 (128 - 169), el hepta- 24 (170 - 193), el octa- 12 (194 - 205), el nona- 3 (206 - 208) y el deca- 1 (209). En la *Figura 3* se muestra la estructura general de los PBDEs.

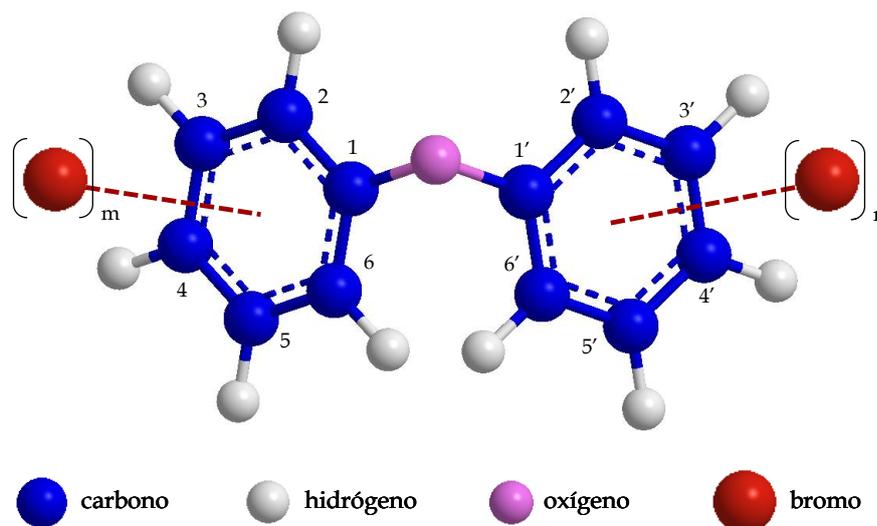


Figura 3. Estructura general de los PBDEs donde $m + n$ está entre 1 y 10

En cuanto a sus propiedades, los PBDEs son sustancias que presentan bajas presiones de vapor ($< 0,1$ Pa), especialmente cuando se comparan con otros compuestos aromáticos halogenados análogos de similar volumen molar como los PCBs, PCDEs o PCNs y alta lipofilicidad.

La presión de vapor de los PBDEs es inversamente proporcional al tamaño de la molécula de modo que por cada átomo de bromo que se incorpora la presión de vapor se reduce en un factor de entre 6 y 9, por lo que cabría esperar que fuera idéntica para todos los congéneres que forman parte de un grupo homólogo. Sin embargo, dentro de cada grupo homólogo se pueden observar variaciones de hasta medio orden de magnitud. En concreto, se sabe que la presión de vapor aumenta en 0,2 unidades logarítmicas como promedio al incorporar un átomo de bromo en posición orto con respecto al éter. Este comportamiento también se ha observado en los PCBs, y se explica teniendo en cuenta que la múltiple sustitución con halógenos en las posiciones

orto entre dos anillos aromáticos distorsiona la planaridad de la molécula haciéndola más volátil. En el caso de los PBDEs se piensa que la explicación puede ser semejante.³²

Por otro lado los PBDEs son sustancias lipofílicas con muy baja solubilidad en agua con coeficientes de partición octanol/agua (K_{ow}) superiores a 10^4 para cualquiera de los grupos homólogos. En la *Tabla 4* se pueden ver los valores de K_{ow} expresados en forma logarítmica para cada grupo homólogo junto con su fórmula química y su peso molecular. Estos valores tan elevados de K_{ow} indican que estos compuestos presentarán una afinidad alta o muy alta por los tejidos grasos y que serán muy poco solubles en agua.

Tabla 4. *Propiedades fisicoquímicas de los PBDEs*

Grupo	Fórmula química	Peso molecular	Log K_{ow} ³³
MBDE	$C_{12}H_9OBr$	249,0	4,1 – 4,9
DiBDE	$C_{12}H_8OBr_2$	327,9	5,03
TrBDE	$C_{12}H_7OBr_3$	406,8	5,5 – 5,6
TeBDE	$C_{12}H_6OBr_4$	485,7	5,9 – 6,2
PeBDE	$C_{12}H_5OBr_5$	564,6	6,6 – 7,0
HxBDE	$C_{12}H_4OBr_6$	643,5	6,9 – 7,9
HpBDE	$C_{12}H_3OBr_7$	722,4	--
OBDE	$C_{12}H_2OBr_8$	801,4	8,4 – 8,9
NBDE	$C_{12}HOBr_9$	880,3	--
DeBDE	$C_{12}OBr_{10}$	959,2	10

Como consecuencia de sus propiedades fisicoquímicas los PBDEs tienden a acumularse en suelos, sedimentos y organismos vivos. En el aire y en las aguas suelen estar presentes como sustancias adsorbidas sobre partículas atmosféricas o partículas en suspensión respectivamente. Los congéneres correspondientes a los grupos homólogos con presiones de vapor más altas (tetra- y penta-) se encuentran repartidos entre la fase vapor y adsorbidos sobre partículas sólidas, aunque predomina su presencia en la fase vapor, mientras que los que presentan presiones de vapor más bajas (hexa- y octa-) se encuentran en mayor medida asociados a partículas sólidas.²⁹

A.1.2.2 Toxicidad de los PBDEs

El uso de los PBDEs como retardantes de llama comenzó en los años 70 en Alemania y su producción ha continuado hasta la actualidad. El proceso de fabricación industrial de PBDEs consiste en la bromación de difenil éter en presencia de un catalizador. Los productos técnicos obtenidos mediante esta reacción no están formados por un único congénere sino que se obtienen mezclas que contienen distintos porcentajes de algunos de ellos. Estas mezclas comerciales reciben el nombre de c-pentaBDE, c-octaBDE y c-decaBDE y su composición se puede ver en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Composición de las mezclas comerciales de PBDEs³³

Mezcla comercial	Composición (%)							
	TrBDE	TeBDE	PeBDE	HxBDE	HpBDE	OBDE	NBDE	DeBDE
c-decaBDE							0,3-3	97-98
c-octaBDE				10-12	43-44	31-35	9-11	0-1
c-pentaBDE	0-1	24-38	50-62	4-8				

Las mezclas comerciales c-pentaBDE y c-octaBDE se emplearon ampliamente hasta el año 2004. La mezcla c-pentaBDE se empleó sobre todo en espumas flexibles de poliuretano para la fabricación de muebles y colchones y la mayor parte del consumo de esta mezcla comercial tuvo lugar en Estados Unidos. La mezcla c-octaBDE se utilizó fundamentalmente en plásticos acrilonitrilo-butadieno-estireno (ABS) para la fabricación de carcasas de dispositivos electrónicos. Su consumo fue menor que el de c-pentaBDE y su principal mercado se situó los países asiáticos.

La mezcla c-decaBDE, compuesta principalmente por el congénere 209, ha sido sin duda la más utilizada en todo el mundo, especialmente a partir del año 2004 en que se dejaron de producir las mezclas c-pentaBDE y c-octaBDE. La mezcla c-decaBDE destaca por resultar muy económica ya que con pequeñas cantidades de la misma es posible alcanzar su capacidad de retardador de llama. Se utiliza fundamentalmente en la fabricación de productos basados en poliestireno de alto impacto (HIPS) y en textiles, equipamiento electrónico y materiales de construcción.

Como ya se ha comentado anteriormente, los PBDEs se incorporan a los polímeros como aditivos y por ello pueden liberarse con facilidad al medioambiente.^{34,35} Su

entrada en el medioambiente puede tener lugar durante su proceso de manufactura o en el proceso de fabricación de materiales o productos que los contengan, en el periodo de uso de estos productos y en su proceso de reciclado.

El amplio uso a nivel mundial de los PBDEs como retardantes de llama ha supuesto la dispersión de los mismos en todos los compartimentos medioambientales. Así, en 1979 se detectó la presencia de BDE-209 en partículas atmosféricas,³⁴ suelos y lodos residuales³⁶ recogidos en zonas próximas a plantas de producción de la mezcla comercial c-decaBDE. Dos años más tarde se encontraron por primera vez PBDEs en biota, en concreto en muestras de pescado recogidas en un río próximo a varias industrias textiles.³⁷ En 1987 se sugirió por primera vez la idea de que los PBDEs podrían ser contaminantes globales, ya que se detectaron en niveles superiores de la cadena trófica y en puntos muy alejados de los lugares donde se habían fabricado y empleado.³⁸ Posteriores estudios confirmaron la amplia distribución de PBDEs a lo largo de todo el planeta, encontrándose niveles cada vez más elevados³⁴ de estas sustancias en muestras medioambientales,³⁹ biológicas⁴⁰ y en alimentos.⁴¹

Puesto que los PBDEs están presentes de forma generalizada en nuestro entorno, los seres vivos estamos expuestos a ellos de forma continua. La principal vía de exposición es a través de la cadena alimentaria. Los peces y organismos marinos están expuestos a los PBDEs presentes en aguas y suelos, de forma que a lo largo de su vida van acumulando estas sustancias en sus tejidos grasos. A continuación, los depredadores de los distintos niveles de la cadena trófica se alimentan de los organismos de niveles inferiores, incorporando así toda la carga de PBDEs que sus presas habían acumulado y dando lugar al proceso de biomagnificación.^{42,43,44} Existen estudios que confirman que, en los últimos 30 años, la concentración de PBDEs en biota ha crecido exponencialmente hasta el punto que ha llegado a duplicarse en periodos de tiempo que van de los 4 a los 6 años.⁴⁰ En la *Figura 4* se puede observar la tendencia temporal de PBDEs (suma de los congéneres 28, 47, 66, 85, 99, 100, 153, 154) en leche materna de madres suecas.⁴⁵

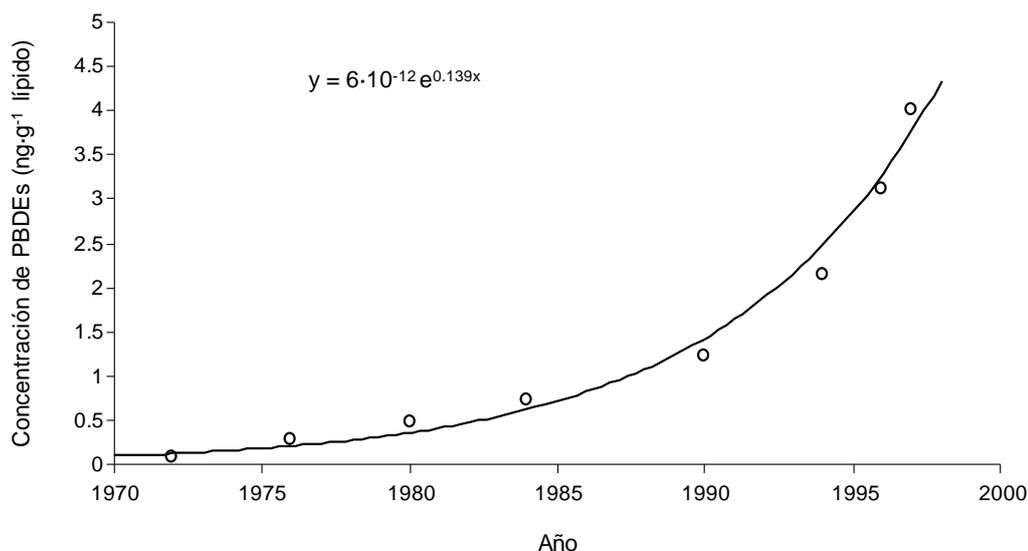


Figura 4. Tendencia temporal en la concentración de PBDEs en leche materna de madres suecas

El ser humano también está expuesto de forma continua a los PBDEs. Como ocurre con otras especies, la vía de exposición más importante es la cadena alimentaria, especialmente para los PBDEs con grados de bromación más bajos (tetra- y penta-) y principalmente a través de la ingesta de alimentos con alto contenido en grasas como pueden ser algunos pescados, carnes y productos lácteos. Por otro lado la inhalación es también una potencial vía de exposición en seres humanos ya que, la liberación de PBDEs desde muebles o aparatos electrónicos que los contengan pueden dar lugar a bajas concentraciones en atmósferas cerradas que, tras una exposición prolongada, pueden aportar a nuestro organismo una considerable carga de estas sustancias.⁴⁶ Cuando la entrada de PBDEs en el organismo se produce por inhalación o a través de la dieta, estas sustancias llegan hasta los pulmones y el estómago respectivamente, pasando con gran facilidad al torrente sanguíneo. Estas dos vías de entrada suponen por tanto un riesgo muy elevado para la salud. La exposición por vía dérmica puede tener lugar a través del contacto con productos que contengan PBDEs como polímeros y textiles y, aunque esta vía de exposición es mucho menos importante, ya que es mucho más improbable que estas sustancias atraviesen la piel y se incorporen al flujo sanguíneo, también ha de ser tenida en cuenta.⁴⁷

Como consecuencia de la exposición continuada los seres humanos hemos ido incorporando estas sustancias en nuestro organismo, encontrándose niveles considerables de PBDEs en sangre,^{48,49} leche materna^{50,51} y tejidos grasos.^{52,53} Los niños son un grupo especialmente expuesto a PBDEs. A pesar de que las vías de exposición

son prácticamente las mismas que las de los adultos, los niños beben más líquidos, comen más e inspiran más aire en relación con su peso corporal y la superficie de su piel es mayor en proporción a su volumen corporal.⁵⁴ Además, se sospecha que, como ocurre con otras familias de POPs, los PBDEs pueden pasar al feto tras atravesar la placenta.⁵⁵ Este hecho junto con su elevada tendencia a concentrarse en la leche materna convierte a los niños en un grupo especialmente susceptible a la exposición a PBDEs. Por ello se debe prestar especial atención sobre los potenciales efectos adversos que puedan ejercer sobre su salud.

Puesto que las propiedades que presentan los distintos congéneres difieren ligeramente de unos a otros, no todos ellos tendrán la misma capacidad para entrar en los organismos vivos, distribuirse, acumularse y ser eliminados, sino que actuarán de manera diferente dependiendo de su estructura química. En este sentido los congéneres con grados de bromación más bajos son los que tienen mayor facilidad para entrar en nuestro organismo. Además, los PBDEs pueden sufrir procesos de degradación en suelos y sedimentos por la acción de la luz natural formando otros congéneres con grados de bromación más bajos.⁵⁶ Este aspecto debe ser tenido en cuenta ya que también favorecerá la acumulación de PBDEs con grados de bromación inferiores en los organismos vivos. Así es que, en general, el congénere 47 (tetra) es el que suele encontrarse más frecuentemente y a niveles más altos de concentración en muestras de origen biológico, seguido de los congéneres 99 y 100 (penta) y 153 y 154 (hexa).²⁹

Una vez que los PBDEs se han introducido en un organismo vivo pueden transformarse parcialmente dando lugar a ciertos subproductos o metabolitos. Existen estudios que demuestran que el metabolismo de los PBDEs en seres vivos depende de la estructura y el número de sustituciones con bromo que presenta cada congénere,⁵⁷ así como de la especie biológica a la que se haya incorporado. Según algunas publicaciones,⁵⁸ los principales metabolitos del congénere BDE-99 generados *in vivo* en ratas o ratones son los obtenidos por vía oxidativa como los congéneres hidroxilados (HO-PBDEs) o metoxilados (MeO-PBDEs), mientras que en carpas los principales metabolitos se producen por deshalogenación reductiva dando lugar a PBDEs con grados de bromación inferiores.⁵⁹ En cuanto a los seres humanos, se ha demostrado que las células hepáticas metabolizan el congénere BDE-99 *in vitro* por vía oxidativa⁵⁸ y además se ha confirmado la presencia de algunos congéneres hidroxilados en la

sangre,⁶⁰ por lo que se supone que el metabolismo de PBDEs tendrá lugar de manera similar en el organismo humano. El principal problema que presenta la formación de estos metabolitos es que suelen provocar más efectos adversos y más negativos que sus homólogos no hidroxilados.⁶¹

En cuanto al periodo de permanencia y eliminación de los PBDEs y sus metabolitos en organismos vivos también se observa distinto comportamiento de unos congéneres a otros. El congénere BDE-209 y sus metabolitos se eliminan en pocos días, principalmente a través de las heces y en menor medida a través de la orina. En cambio los compuestos con grados de bromación más bajos (tetra-, penta- y hexa-) pueden acumularse y permanecer dentro de un organismo durante años, distribuyéndose entre los distintos tejidos.

Puesto que los PBDEs presentan gran lipofilicidad se acumularán preferentemente en los tejidos grasos. Algunos estudios con animales,⁵⁷ principalmente ratas y ratones, en los que los PBDEs se administraron por vía oral, confirman que se distribuyen en mayor medida en los tejidos grasos, como el tejido adiposo,⁶²⁻⁶⁴ el hígado,^{62,64} las glándulas suprarrenales,⁶³ los pulmones,⁶² los riñones,⁶² el tracto gastrointestinal,⁶³ la piel^{63,64} y los músculos⁶⁴ y en menor medida en la sangre y el cerebro. En seres humanos, los datos existentes sobre el contenido de PBDEs en muestras de tejidos adiposos, hígado, leche y sangre indican que estos compuestos tienen tendencia a acumularse en estos tejidos, aunque, hasta el momento no se han llevado a cabo estudios de distribución completos en seres humanos que descarten la posibilidad de que estos compuestos se acumulen también en otros tejidos.

Las consecuencias que puede traer la presencia de PBDEs en los organismos vivos no se conocen con exactitud. Sin embargo existen estudios que relacionan estas sustancias con importantes efectos adversos sobre la salud. Durante mucho tiempo la mayoría de los estudios de toxicidad se han llevado a cabo mediante el uso de las mezclas comerciales existentes, por lo que existen escasos datos acerca de la toxicidad específica de los distintos congéneres.⁶⁵

Uno de los problemas toxicológicos más importantes asociado a la exposición a PBDEs es su capacidad para alterar la función de las hormonas naturales presentes en el organismo (estrógenos, andrógenos progestágenos y hormona tiroidea), responsables

de mantener la homeostasis y controlar el desarrollo, la reproducción y el comportamiento de los individuos.⁶⁶

El sistema tiroideo parece ser el más afectado por estas sustancias, observándose efectos adversos incluso a bajas dosis de exposición.⁶⁷ Esto se puede explicar teniendo en cuenta la semejanza estructural (*Figura 5*) que presentan los PBDEs y algunos de sus metabolitos hidroxilados⁶⁸ con la hormona tiroidea (TH), lo que les permite competir con ella para unirse a sus receptores (THRs) y a las proteínas que la transportan por el plasma (TTR y TBG),^{69,70} provocando así una disminución en la concentración de TH.⁷¹ Por otro lado, los PBDEs son capaces de inducir la actividad de la enzima microsomal hepática UDGPT (uridin-difosfato-glucuronosil transferasa), capaz de acelerar el proceso de eliminación de T₄ en el hígado, contribuyendo también a la reducción en los niveles de esta hormona en suero.^{71,72}

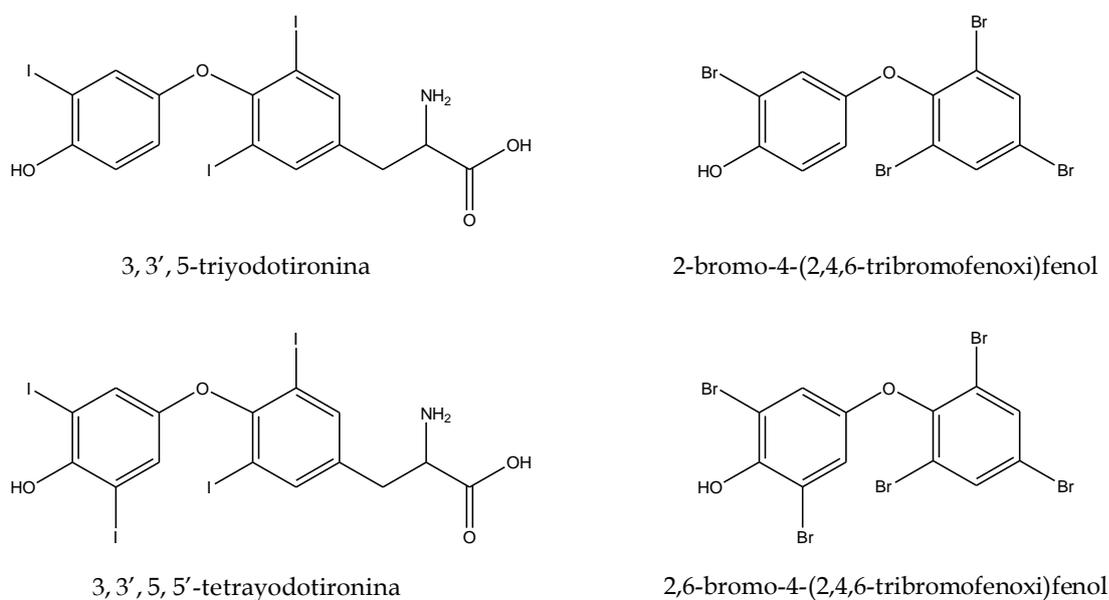


Figura 5. Hormonas tiroideas T₃ y T₄ y PBDEs hidroxilados equivalentes

Otros efectos adversos observados se deben a que los metabolitos hidroxilados de los PBDEs, además de desplazar a T₄ de su lugar de unión con las proteínas que la transportan, también pueden unirse a los THRs que se encuentran en el núcleo de las células, influyendo sobre la regulación de la expresión génica mediada por receptores dependientes de la TH.³⁴

Puesto que el desarrollo del sistema nervioso central depende en gran medida de la función de la TH, cualquier desequilibrio que se pueda producir en su homeostasis puede provocar importantes problemas de toxicidad en el desarrollo neurológico.

La información acerca de los efectos que los PBDEs y sus metabolitos pueden tener sobre la homeostasis de la TH en humanos es bastante limitada. Sin embargo, el aumento observado en los casos de hipotiroidismo en trabajadores dedicados a la producción de c-decaBDE³⁴ junto con los resultados obtenidos en estudios con animales hace presuponer que el sistema tiroideo es un blanco de toxicidad en seres humanos expuestos.⁵⁴

Los PBDEs pueden afectar también a la función de las hormonas sexuales (estrógenos, andrógenos y prostagésstágenos). Estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro* sugieren que los PBDEs y algunos de sus metabolitos pueden actuar como agonistas o antagonistas (Figura 6) de receptores androgénicos (AR), estrogénicos (ER) y progestagénicos (PR).⁷³ También se ha demostrado que los metabolitos hidroxilados de los PBDEs son capaces de inhibir la actividad de ciertas enzimas provocando el aumento en el nivel de estrógenos endógenos biodisponibles.⁷⁴

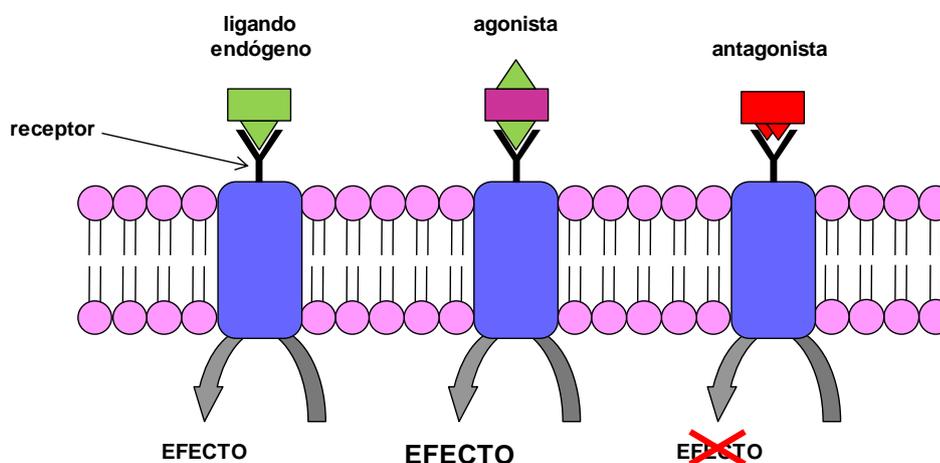


Figura 6. Acción agonista y antagonista de los disruptores hormonales

Estudios llevados a cabo para determinar la potencia de algunos PBDEs individuales, congéneres hidroxilados y las mezclas comerciales c-penta y c-octaBDE, como disruptores endocrinos demuestran que ninguno de ellos posee actividad como agonista de AR y PR. Sin embargo, la mayoría de ellos resultaron ser antagonistas de AR y, en menor medida, de PR, siendo los congéneres con grados de bromación más bajos los que mostraron un mayor potencial como antagonistas de AR. Los congéneres

con grados de bromación más bajos mostraron también una cierta actividad como agonistas de ER, mientras que los más bromados y los compuestos hidroxilados mostraron actividad como antagonistas de ER.⁷⁵

Puesto que los congéneres que se han encontrado con más frecuencia y a niveles más elevados de concentración en biota son aquellos que presentan grados de bromación más bajos, se puede decir que, en general, los PBDEs presentan un efecto estrogénico y una inhibición de la actividad androgénica endógena. Como consecuencia se van a producir cambios tanto en el tracto reproductor masculino como en el femenino, que pueden dar lugar a importantes alteraciones reproductivas y en el desarrollo (resorciones fetales, edemas subcutáneos, reducción del peso fetal medio, retraso en el desarrollo óseo y malformaciones en el feto, retrasos y alteraciones en el desarrollo puberal, cambios en el sistema reproductivo tanto en machos como en hembras y problemas de infertilidad)^{33,73,76,77} y favorecer la aparición de ciertos tipos de cáncer relacionados con la actividad de dichas hormonas.

El sistema nervioso central resulta potencialmente susceptible a la exposición a PBDEs, especialmente para aquellos individuos que se encuentran en su etapa de crecimiento y desarrollo del cerebro. Los mecanismos por los cuales los PBDEs desarrollan neurotoxicidad no se conocen con certeza, aunque se piensa que puede haber dos posibilidades no excluyentes que son el efecto directo de estas sustancias sobre el cerebro en desarrollo y las posibles alteraciones que pueden provocar en la homeostasis de la TH.⁷³

Los efectos neurotóxicos pueden provocar alteraciones en el comportamiento (hiperactividad y deterioro del comportamiento motor espontáneo), que se ven prolongados hasta la edad adulta, pudiendo incluso, en algunos casos, empeorar con la edad. La capacidad de aprendizaje y la función de memoria también pueden verse afectadas por la exposición a algunos de los congéneres.^{65,73,78}

Además algunos estudios de fetotoxicidad indican que, en general, los fetos son más sensibles a los PBDEs que las madres, provocando, en muchos casos, consecuencias a largo plazo en las crías.⁶⁵

También se ha demostrado la potencial hepatotoxicidad de los PBDEs, observándose la inducción de las enzimas microsomales hepáticas, el aumento del tamaño del hígado y alteraciones histopatológicas degenerativas o no degenerativas del mismo.⁷⁹ La

incidencia y severidad de los efectos adversos hepáticos provocados por los PBDEs dependen generalmente de la dosis administrada y se manifiestan con mayor frecuencia e intensidad en los machos que en las hembras. Estos efectos son también más pronunciados para la exposición a las mezclas comerciales c-pentaBDE y c-octaBDE que para la c-decaBDE.⁷⁹

Uno de los problemas hepáticos relacionados con la exposición a PBDEs es la producción excesiva de porfirinas en el hígado. Este trastorno hepático se conoce como porfiria hepática crónica y se caracteriza por la elevada concentración de porfirinas tanto en el hígado como en la orina. Las mezclas comerciales c-pentaBDE y c-octaBDE poseen un alto potencial porfirinogénico según han demostrado ciertos estudios realizados con ratas e *in vitro* respectivamente.⁶⁵

Por otra parte, se sabe que las dioxinas y algunos otros compuestos denominados “*dioxin-like*” (DLCs), con comportamiento toxicológico similar al de las dioxinas, son capaces de unirse al factor de transcripción citosólico denominado receptor de dioxinas (AhR), cuya función es la inducción de la actividad de enzimas detoxificantes en el hígado. Este mecanismo constituye la respuesta metabólica adaptativa para proteger a los organismos vivos de la exposición a ciertas sustancias tóxicas. Los PBDEs presentan capacidades de inducción relativamente bajas, por lo que no pueden inducir la actividad de enzimas detoxificantes. Sin embargo, las mezclas comerciales son capaces de inducir enzimas de detoxificación de fases I y II en el hígado³⁴ debido a las impurezas generalmente presentes en las mezclas comerciales (PCDDs y PCDFs).^{80,81} El producto técnico c-decaBDE, presenta una capacidad de inducción enzimática inferior a la de otras mezclas comerciales, resultando por tanto menos tóxico.³⁴

Los PBDEs no parecen tener un alto potencial genotóxico, mutagénico⁶⁵ ni carcinogénico, aunque existen ciertas evidencias de la carcinogenicidad de c-decaBDE en animales.⁸² Basándose en esta evidencia la EPA ha decidido clasificar al DeBDE como posible carcinógeno para los seres humanos, mientras que considera no clasificables por su carcinogenicidad a los PBDEs que presentan grados de bromación inferiores. Otros organismos como IARC o el Departamento de Salud y Servicios humanos de los Estados Unidos (DHHS) consideran a los PBDEs como sustancias no clasificables por su carcinogenicidad.⁵⁴ Sin embargo, cabe destacar que, a pesar de que la potencial carcinogenicidad de los PBDEs no es de por sí muy elevada, la exposición a estas sustancias puede favorecer la proliferación de células tumorales en órganos

dependientes de hormonas, al actuar como disruptores endocrinos, pudiendo imitar y sustituir a ciertas hormonas que regulan ciertos procesos bioquímicos que ocurren en el organismo

La exposición a PBDEs puede provocar también efectos adversos en el sistema inmune, aunque debido a la escasa información disponible hasta el momento y la discordancia entre los ensayos realizados *in vivo*^{65,79} e *in vitro*³⁴ no es posible caracterizar a los PBDEs en función de su potencial inmunotoxicidad. En todo caso los resultados obtenidos sugieren que los congéneres con grados de bromación más bajos pueden resultar inmunotóxicos para los seres vivos.

A.1.2.3 Legislación de los PBDEs

La amplia distribución de los PBDEs en el medioambiente junto con su gran lipofiliidad, resistencia a la degradación y capacidad para bioacumularse y biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica^{34,43} han despertado gran preocupación sobre los efectos adversos que estas sustancias pueden provocar sobre los seres vivos y el medioambiente. Por ello, distintos organismos oficiales dedicados a la protección de la salud pública y la conservación del medioambiente han tomado medidas para el control de estas sustancias y como consecuencia, la producción y el uso de los PBDEs como retardantes de llama ya han sido prohibidos o restringidos tanto en la Unión Europea (EU) como en otros países del mundo.

En la EU los fabricantes de las mezclas comerciales c-pentaBDE y c-octaBDE cesaron voluntariamente la producción de estas sustancias en el año 1997 y su uso se redujo de forma considerable durante la segunda mitad de los años 90. Además, a partir del año 2000, la legislación Europea promulgó varias normativas para la regulación del empleo de los PBDEs y la distribución y el reciclado de productos que los contuvieran, así como para definir los valores máximos de estas sustancias que son admisibles en algunos compartimentos medioambientales sin que supongan un riesgo inaceptable para los seres vivos.

La Directiva 76/769/EEC⁸³ entró en vigor en el año 1976 y estuvo vigente hasta mayo de 2009. Esta Directiva limitaba la comercialización y el uso de ciertas sustancias y preparados considerados como peligrosos. En un principio el anexo de la Directiva constó de un total de 6 sustancias, grupos de sustancias o preparados con sus restricciones correspondientes. Con el paso del tiempo, se fueron proponiendo y

aceptando enmiendas a esta Directiva y así se fueron introduciendo nuevas sustancias en la lista de sustancias a controlar. En agosto de 2004 la Directiva 76/769/EEC fue modificada por la Directiva 2003/11/EC⁸⁴ incluyendo a los PBDEs dentro del grupo de sustancias a controlar por los Estados miembros. Se prohibió la comercialización y el uso de las mezclas comerciales c-pentaBDE y c-octaBDE como sustancias o en mezclas en concentraciones superiores al 0.1 % en peso, así como el uso de artículos que los contengan, a ellos mismos o a alguna de sus piezas pirorretardantes, en concentraciones superiores al 0.1 % en peso, quedando la mezcla c-decaBDE pendiente de la evaluación de riesgos.

En junio de 2007 entró en vigor la Reglamento (EC) N° 1907/2006 para el Registro, Evaluación y Autorización de Sustancias y Preparados Químicos (REACH),^{85,86} derogando la Directiva 76/796/EEC. Esta Regulación, gestionada por la Agencia Europea de Productos Químicos (ECHA) se ocupa de la identificación, etiquetado y gestión de la puesta en el mercado y uso de productos químicos y está destinada a regular o prohibir ciertas sustancias y usos que presenten un riesgo inaceptable para la salud o el medioambiente, pudiendo ser objeto de restricciones cualquier sustancia sola, en un preparado o en un artículo. Las mezclas de PBDEs, c-pentaBDE y c-octaBDE, puesto que ya estaban incluidas dentro del grupo de sustancias restringidas por la Directiva 76/769/EEC, fueron directamente incluidas en el Anexo XVII de la Regulación, que contiene la lista de todas las sustancias restringidas y especifica los usos para los que se han restringido. Según el Reglamento REACH, y al igual que en la Directiva 2003/11/EC los PBDEs (c-pentaBDE y c-octaBDE) no pueden comercializarse ni utilizarse como sustancia en mezclas en concentraciones superiores al 0,1 % en peso y tampoco pueden utilizarse en artículos que los contengan, a ellos mismos o en alguna de sus piezas pirorretardantes, en concentraciones superiores al 0,1 % en peso. No obstante, en una de las modificaciones de la Regulación REACH, en concreto en el Reglamento (EC) N° 552/2009,⁸⁷ se incluyen dos excepciones al empleo de artículos que contengan PBDEs con concentraciones superiores al 0,1 % para aquellos artículos que estaban en uso dentro de la Comunidad con anterioridad al 15 de agosto de 2004 y para los aparatos eléctricos y electrónicos contemplados en la Directiva 2002/95/EC (RoHS)⁸⁸ del Parlamento Europeo y del Consejo. En algunos países como Noruega o Suiza, son clasificados como residuos peligrosos y descartados todos aquellos productos que tengan contenidos de c-pentaBDE y c-octaBDE superiores al 0,25 %.

La Directiva 2002/95/CE de Restricción de Sustancias Peligrosas (RoHS)⁸⁸ fue adoptada en febrero de 2003 por la EU y entró en vigor el 1 de julio de 2006. Esta Directiva prohibía el uso de ciertas sustancias, consideradas peligrosas, en la fabricación de equipos eléctricos y electrónicos. Las tres mezclas comerciales c-penta, c-octa y c-decaBDE fueron en principio incluidas en la lista de sustancias a eliminar. Sin embargo, la mezcla c-decaBDE fue excluida de nuevo debido a las escasas evidencias sobre su peligrosidad. Tras una revisión posterior, la EU llegó a la conclusión de que c-decaBDE debía de ser nuevamente incluida en la lista de sustancias de la Directiva RoHS, prohibiéndose su utilización en nuevas aplicaciones eléctricas y electrónicas a partir de julio de 2008. Finalmente, debido a la imposibilidad de suprimir completamente de los aparatos eléctricos y electrónicos las sustancias que habían sido clasificadas como peligrosas, la EU tuvo que enmendar esta Directiva mediante la Decisión 2005/618/CE,⁸⁹ que fija un valor máximo de 0.1% del peso total para el contenido de PBDEs en materiales homogéneos, es decir, no para el producto final sino para cada componente del mismo.

La Directiva 2002/96/EC sobre Residuos de Aparatos Eléctricos y Electrónicos (WEEE)⁹⁰ fue creada para proteger la calidad del medio ambiente y la salud humana mediante el uso responsable de los recursos naturales y la adopción de estrategias de gestión de residuos basadas en el reciclaje y la reutilización. Esta Directiva entró en vigor en agosto de 2005 y obliga a que los fabricantes de la mayor parte de equipos eléctricos sean responsables de sus productos cuando llegue el final de su vida útil. Entre las responsabilidades de los fabricantes se encuentran las de cumplir los requisitos de etiquetado, proporcionar información a los usuarios finales y a las instalaciones para su tratamiento, asegurar la disponibilidad de infraestructura para la recolección, enviar datos de ventas y recuperación, y financiar los gastos derivados de la WEEE.

En España, la Directiva RoHS junto con la WEEE han sido transpuestas al mismo Real Decreto, el R.D. 208/2005 de 25 de febrero sobre aparatos eléctricos y electrónicos y la gestión de sus residuos.⁹¹

Por otro lado también se han establecido normativas que obligan a llevar a cabo unos registros sobre la cantidad de PBDEs emitida o vertida al medioambiente así como los valores máximos permitidos de estas sustancias en algunos compartimentos medioambientales.

El Reglamento (EC) N° 166/2006,⁹² que entró en vigor en febrero de 2006, tiene como objetivo la creación, a nivel de la EU, de un registro de emisiones y transferencias de contaminantes (PRTRs) en forma de base de datos electrónica accesible al público, dentro del que se deben incluir todas aquellas sustancias o un grupos de sustancias que puedan resultar perjudiciales para el medio ambiente o la salud humana debido a sus propiedades y a su introducción en el medio ambiente. Los PBDEs han sido considerados contaminantes e incluidos en el anexo II de este Reglamento, que indica que el umbral de emisiones por encima del cual debe notificarse la emisión de estas sustancias es de 1 kg año⁻¹ tanto para aguas como para suelos. En España el Real Decreto 508/2007⁹³ establece normas adicionales para el suministro de la información necesaria para cumplir con el PRTRs.

Además, en España el Real Decreto 9/2005, que establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados, define un suelo contaminado como aquel en el que están presentes de sustancias químicas de carácter peligroso y de origen humano que pueden alterar las características tanto químicas como físicas o biológicas del suelo, lo que puede comportar un riesgo para la salud humana y el medio ambiente. Regula también los llamados niveles genéricos de referencia, parámetro básico que se utiliza para la evaluación de la contaminación del suelo por determinadas sustancias, las cuales están agrupadas en razón de su peligrosidad para la salud humana y para los ecosistemas. Los PBDEs han sido incluidos dentro de la lista de contaminantes que pueden suponer un riesgo inaceptable para los ecosistemas, estableciéndose los niveles genéricos de referencia recogidos en la *Tabla 6*. Hasta la fecha no existe en la legislación europea ninguna normativa que regule la contaminación de los suelos.

Tabla 6. Niveles genéricos de referencia (mg/kg peso seco⁻¹) establecidos en el RD 9/2005 para los PBDEs

Sustancia	Número CAS	Organismos del suelo	Organismos acuáticos	Vertebrados terrestres
pentaBDE	32534-81-9	0,32	5,18	0,01*
octaBDE	32536-52-0		0,51	0,24
decaBDE	1163-19-5		2,66	59,7

* Límite inferior de detección

La Directiva 2000/60/EC,²⁴ también conocida como Directiva Marco del Agua (WFD), establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. Esta Directiva entró en vigor en diciembre de 2000 con unos objetivos claros que eran la prevención y la reducción de la contaminación, la promoción del uso sostenible del agua, la protección del medio ambiente, la mejora de la situación de los ecosistemas acuáticos y la atenuación de los efectos de las inundaciones y de las sequías. Para combatir la contaminación de las aguas, la Comisión propuso una lista de sustancias que debían ser consideradas como prioritarias, tras evaluar los riesgos que estas podían ejercer sobre el medio acuático o a través de él. Esta lista fue aprobada en 2001 a través de la Decisión 2455/2001/EC⁹⁴ incluyendo un total de 33 sustancias prioritarias, dentro de las que se incluyen los PBDEs. La WFD también exigió la definición de unas normas de calidad ambiental (EQS) aplicables al agua, que son los límites de concentración máximos permitidos para las sustancias incluidas dentro de la lista de sustancias prioritarias y que definen el buen estado de las aguas. Las EQS fueron recogidas en la Directiva 2008/105/EC o Directiva EQS,⁹⁵ que entró en vigor en enero de 2009 y que exige que el buen estado de las aguas sea alcanzado por todos los Estados Miembros para el año 2015. Para los PBDEs, esta Directiva establece unas EQS de $0,0005 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para aguas superficiales continentales y de $0,0002 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para otras aguas superficiales, ambas expresadas como media anual. Debido a sus características fisicoquímicas los PBDEs se encontrarán a niveles de concentración muy bajos en el agua ya que poseen una baja solubilidad en agua y una elevada capacidad para bioacumularse y biomagnificarse. La Directiva EQS sugiere a los Estados Miembros la monitorización de los PBDEs, junto con la de otras sustancias que presentan este mismo comportamiento, en otras matrices que sirvan para valorar mejor el estado químico de las aguas, como por ejemplo en sedimentos, material particulado en suspensión y en biota,⁹⁶ siendo en este caso necesario establecer unas EQS para las nuevas matrices que aseguren un nivel de protección equivalente al de las EQS establecidas por la Comunidad Europea para aguas.⁹⁷

La trasposición de la WFD en España se realizó mediante la Ley 62/2003,⁹⁸ de medidas fiscales, administrativas y del orden social que incluye, en uno de sus artículos, la modificación del texto refundido de la Ley de Aguas, aprobado por Real Decreto Legislativo 1/2001.⁹⁹ La Directiva EQS fue transpuesta mediante el Real Decreto 60/2011,¹⁰⁰ que incorpora además los requisitos técnicos sobre análisis químicos establecidos en la Directiva 2009/90/EC,¹⁰¹ que establece los criterios mínimos que se

deberán aplicar a los métodos de análisis para el seguimiento del estado de las aguas, sedimentos y seres vivos, así como las normas dirigidas a demostrar la calidad de los resultados analíticos.

En otros países del mundo también se han tomado medidas para el control de la producción, el uso y la importación de PBDEs o productos que los contengan.

En Estados Unidos la industria cesó voluntariamente la producción de c-pentaBDE y c-octaBDE desde el año 2005. Además, se ha incluido a los PBDEs dentro de su Ley de control de Sustancias Tóxicas (TSCA), que obliga, a partir del año 2006, a informar a la USEPA de la producción o importación de estas sustancias para cualquier uso. Por su parte, algunos estados, como California, Washington, Maine, Alaska, Hawaii, Connecticut, Illinois, Maryland, Michigan Minnesota, New York, Vermont, Oregon o Rhode Island, ya han propuesto o aprobado sus propias normativas para la prohibición o restricción en el uso de los PBDEs.

En Canadá, según un estudio realizado, en el año 2000 no se producían ninguna de las mezclas comerciales de PBDEs, aunque sí que se importaban para ser añadidos a ciertos productos. En 2008 se publicó la versión definitiva de la Regulación de Difenil Éteres que prohíbe la manufactura de siete grupos homólogos de PBDEs (TeBDE, PeBDE, HxBDE, HpBDE OBDE, NBDE y DeBDE) y mezclas, polímeros y resinas que los contengan, así como el uso, venta, oferta e importación de TeBDE, PeBDE, HxBDE y de mezclas, polímeros y resinas que los contengan.

En China la producción de c-pentaBDE fue reduciéndose progresivamente hasta que cesó definitivamente en 2007. Además, en febrero de 2006 China promulgó una ley semejante a la Directiva RoHS de la EU, que prohibirá el uso de c-pentaBDE y c-octaBDE en nuevos equipos eléctricos y electrónicos. La fecha en la que esta ley será implementada definitivamente todavía no está clara.

En Japón, en la actualidad, no se producen ni la mezcla c-pentaBDE ni la c-octaBDE. Además, los productos que pudieran contener las mezclas c-pentaBDE o c-octaBDE fueron retirados del mercado voluntariamente en los años 1990 y 2005 respectivamente.

En Australia no está permitido el empleo de la mezcla c-pentaBDE en nuevos artículos. Sin embargo, aunque se recomienda a los principales importadores evitar la

introducción de productos que contengan esta sustancia en el país, todavía no existe ninguna regulación que controle la importación de BFRs.

Por último, algunos países han adoptado libremente acuerdos internacionales para la conservación del medioambiente, en los que se citan a estos compuestos.

Como ya se ha comentado previamente, el Convenio de Estocolmo es un tratado global que, respaldado por UNEP, regula el tratamiento de las sustancias tóxicas y trabaja para que los países miembros, entre los que se incluyen tanto España como la Unión Europea, restrinjan el uso y producción de estas sustancias hasta su total eliminación. Este Convenio fue adoptado en el año 2001 y entró en vigor tres años después. En 2005 y 2006 algunos países que firmaron el Convenio de Estocolmo consideraron que el uso de las mezclas comerciales c-pentaBDE y c-octaBDE podían ejercer importantes efectos adversos sobre los seres vivos y el medioambiente. Tras llevar a cabo estudios para la evaluación de la gestión de riesgos derivados del empleo de estas mezclas comerciales, el Comité de Revisión (POPRC) decidió en 2009 incluirlas dentro del grupo de sustancias consideradas como POPs ya que cumplen todos los criterios, en términos de persistencia, bioacumulación, potencial capacidad para ser transportadas a largas distancias y efectos adversos sobre los seres humanos y el medioambiente, que exige el anexo D del Convenio de Estocolmo para que una sustancia sea considerada un POP.

El Convenio Oslo-París (OSPAR) fue el resultado de refundir dos convenios anteriores, el Convenio de Oslo para la prevención de la contaminación marina provocada por vertidos desde buques y aeronaves, y el Convenio de París para la prevención de la contaminación marina de origen terrestre. El Convenio OSPAR fue adoptado en París en 1992 por varios países de la EU, entre ellos España, y entró en vigor en el año 1998. Su objetivo general es la conservación de los ecosistemas marinos, la salud humana y la restauración, cuando sea posible, de las áreas marinas del entorno del Nordeste Atlántico que hayan sido afectadas negativamente por las actividades humanas mediante la prevención y eliminación de la contaminación y su protección. Los PBDEs, junto con otros BFRs, fueron incluidos en la lista de sustancias de acción prioritaria en el año 1998. El objetivo fundamental de este Convenio es la prevención de la contaminación del agua marítima, reduciendo las descargas, emisiones y escapes de las sustancias clasificadas como peligrosas hasta su total eliminación para el año 2020.

El Convenio sobre la Contaminación del Aire Transfronteriza de Largo Alcance (CLRTAP) de la Comisión Económica de las Naciones Unidas para Europa (UNECE) fue firmado en Ginebra en 1979, con la finalidad de limitar, reducir gradualmente y prevenir la contaminación del aire y entró en vigor en el año 1993. Posteriormente se han ido incluyendo distintos protocolos específicos dentro del contenido del CLRTAP, siendo uno de ellos el referido a los POPs que se incluyeron en este convenio a partir del año 1998. La consideración de las mezclas comerciales c-pentaBDE y c-octaBDE dentro del grupo de nuevos POPs según el Convenio de Estocolmo, convirtió también a estas sustancias en nuevos objetivos del CLRTAP desde el año 2009.

El Convenio de Rotterdam, cuya misión es proteger a la población y al medioambiente de los posibles peligros derivados del comercio y la importación de plaguicidas u otros productos químicos peligrosos por su toxicidad, fue adoptado en 1998 y entró en vigor en el año 2004 con un periodo de transición de dos años más. Este Convenio ha sido firmado por más de 100 países de todo el mundo, entre los que se encuentra España y la EU. Aunque los PBDEs aún no han sido incluidos dentro de la lista de sustancias a controlar, en 2003 la EU propuso la mezcla comercial c-pentaBDE como posible candidata a formar parte del grupo de sustancias cuyos riesgos asociados a su importación, manipulación y uso deben ser evaluados.

El Consejo Ártico, del que España es un país observador, fue creado en 1996 por ocho países del Ártico y se ocupa de temas relativos al desarrollo sostenible y la protección del medioambiente del Ártico, así como a la valoración de la efectividad de los acuerdos internacionales para el control de la contaminación medioambiental. En uno de sus Programas de Monitoreo y Evaluación del Ártico (AMAP) este Consejo ha demostrado que los PBDEs han adquirido gran importancia como contaminantes en la zona del Ártico, y como consecuencia, en 2004 se ha puesto en marcha un nuevo proyecto con la finalidad de reducir los niveles de BFRs.

Con todo ello, a pesar de que las mezclas comerciales c-pentaBDE y c-octaBDE dejaron de producirse en Estados Unidos en 2004²⁹ y su uso y comercialización fueron prohibidos en Europa ese mismo año,⁸⁴ según ciertos estudios, la concentración de PBDEs asociados a estas mezclas comerciales siguen aumentando en muestras biológicas y medioambientales.^{29,40} Este hecho puede deberse bien a que todavía existen en el mercado o están en uso, algunos productos que los contienen^{102,103} o bien a que mediante procesos de deshalogenación, los componentes presentes en la mezcla c-

decaBDE se convierten en otros congéneres menos bromados y potencialmente más tóxicos.²⁹ Por ello, los distintos países y organismos están dedicando un gran esfuerzo para la búsqueda de nuevas sustancias que puedan sustituir a los PBDEs como retardantes de llama sin ejercer riesgos sobre el medioambiente y los seres vivos.¹⁰⁴⁻¹¹⁰

A.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS HALOGENADOS

Los contaminantes orgánicos halogenados son, en general, sustancias volátiles o semivolátiles por lo que se suele recurrir a la Cromatografía de Gases (GC) para su separación y determinación. En cuanto a los métodos de preparación de muestra, éstos van a depender del tipo de muestra que se pretenda analizar.

Los THMs se engloban dentro del grupo de los HVOCs y están presentes en aguas, principalmente en aquellas que han sido sometidas a un proceso de desinfección por cloración. Por su parte, los PBDEs son POPs, compuestos semivolátiles que se caracterizan por su persistencia en el medioambiente, su baja solubilidad en agua y su tendencia a acumularse en los tejidos grasos de los seres vivos y a biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica. Por ello, los PBDEs se encontrarán frecuentemente en matrices más complejas, como sedimentos o biota, requiriendo procesos de preparación de muestra más complicados y laboriosos. Para su separación y detección se suele recurrir a la GC, aunque también se han separado en algunos casos mediante cromatografía líquida (HPLC).

A.2.1 Métodos de preparación de muestra

La etapa de preparación de muestra es sin duda el paso más crítico en la mayoría de los análisis químicos. La finalidad de esta etapa es la de separar los compuestos objeto de estudio de la matriz en la que se encuentran y, en muchas ocasiones, preconcentrarlos hasta un nivel que pueda ser detectado por el método analítico. Algunas veces, cuando se trata de muestras complejas, esta etapa también incluye procedimientos de limpieza de los extractos con el fin de facilitar el análisis y evitar el deterioro del sistema cromatográfico y/o del detector utilizados. La preparación de muestra es, con frecuencia, la etapa más laboriosa y la que lleva más tiempo dentro del proceso analítico. Además, los métodos clásicos de pretratamiento de muestra

habitualmente requieren el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos, mucha manipulación de los extractos y constituyen una de las principales fuentes de error del método analítico.

A.2.1.1 Métodos de preparación de muestra para la determinación de THMs en matrices acuosas

Puesto que los THMs se encuentran habitualmente a muy bajos niveles de concentración en las aguas de consumo, es necesario el empleo de técnicas de preconcentración y extracción antes de su separación cromatográfica. La extracción y preconcentración de los THMs desde el agua se realiza fundamentalmente mediante técnicas de extracción líquido-líquido (LLE), de espacio de cabeza estático (HS), purga y trampa (PT) o microextracción en fase sólida (SPME). En cuanto a la etapa de limpieza hay que señalar que las muestras de interés van a ser fundamentalmente aguas de consumo, con matrices limpias, por lo que en general no será necesario someterlas a ningún tratamiento de limpieza.

Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción líquido-líquido (LLE) es la técnica más utilizada para la extracción de especies orgánicas en muestras acuosas. Consiste en mezclar la muestra acuosa con un disolvente orgánico de modo que los compuestos orgánicos hidrófobos abandonarán la fase acuosa incorporándose a la fase orgánica. De esta forma se consigue separar los analitos de sus posibles interferentes a la vez que se preconcentran en la fase orgánica, siempre que el volumen final de fase orgánica sea menor que el volumen original de muestra acuosa. Se trata de una técnica de separación sencilla y robusta, con la que se pueden alcanzar en algunos casos recuperaciones y límites de detección comparables e incluso mejores a los obtenidos con otras técnicas de extracción y preconcentración, resultando además mucho más barata si bien no se puede automatizar con facilidad. La principal desventaja que presenta la LLE es que requiere el manejo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos, lo que supone, además, un mayor riesgo de contaminación de la muestra. A pesar de esto, la LLE sigue empleándose en la actualidad para el control de THMs en aguas,¹¹¹⁻¹¹⁴ puesto que es el método de preparación de muestra recomendado por algunos organismos reguladores en sus métodos normalizados.

Para evitar o minimizar los problemas de la LLE, en los últimos años se están realizando algunas modificaciones que permiten aprovechar sus ventajas en términos de sencillez y versatilidad. Así, han surgido algunas técnicas basadas en el mismo principio que la LLE pero reduciendo en gran medida la cantidad de disolvente empleado para llevar a cabo la extracción. Estas nuevas técnicas se conocen por el nombre de microextracción con disolventes (SME) o, más comúnmente, microextracción en fase líquida (LPME).

La microextracción en gota (SDME)¹¹⁵ es una miniaturización de la LLE que utiliza como fase extractante una microgota (1-10 μL) de un disolvente orgánico, un líquido iónico o un surfactante. La muestra acuosa se coloca en un vial sellado herméticamente y se perfora con una microjeringa en cuya aguja quedará suspendida la microgota. Una vez que se alcanza el equilibrio entre la muestra y la fase extractante, la gota es retirada e inyectada en el cromatógrafo de gases para la separación y detección de los analitos. La SDME permite trabajar tanto en el modo de inmersión directa como en el modo de espacio de cabeza. En la *Figura 7* se puede observar un esquema de la SDME en sus dos modos de trabajo. La SDME es sencilla, barata, rápida, emplea cantidades muy pequeñas de disolvente y no requiere ninguna instrumentación específica. Además, combina en un solo paso las etapas de extracción, preconcentración e inyección de la muestra. Como únicas desventajas se puede mencionar la posible inestabilidad de la gota y la capacidad de preconcentración relativamente baja que proporciona.

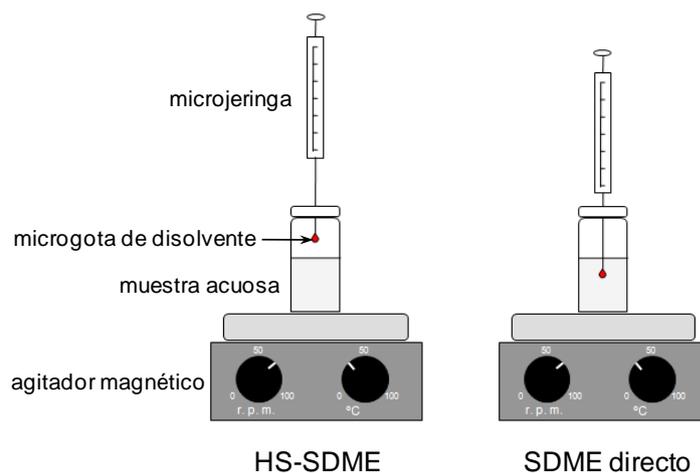


Figura 7. Esquema de un sistema SDME

La microextracción líquida dispersiva (DLLME)¹¹⁶ es una variante de la SDME en la que la gota de disolvente extractante, junto con una cantidad apropiada de un agente

dispersante, es inyectada con rapidez sobre la muestra acuosa que contiene los analitos de interés. El agente dispersante favorece la distribución del extractante por toda la muestra acuosa, de forma que se genera una gran superficie de contacto entre ambas fases, favoreciendo y acelerando la etapa de transferencia de los analitos a la fase orgánica. Posteriormente la mezcla se centrifuga con el fin de separar las dos fases y se recoge la fase orgánica, que es posteriormente inyectada en un cromatógrafo de gases equipado con un detector adecuado. Las principales ventajas de esta novedosa técnica son su rapidez y sencillez. Además resulta relativamente barata y no requiere instrumentación específica. Como desventajas cabe mencionar que no es una técnica fácilmente aautomatizable y que requiere bastante manipulación de la muestra. La *Figura 8* muestra un esquema del funcionamiento de esta técnica.

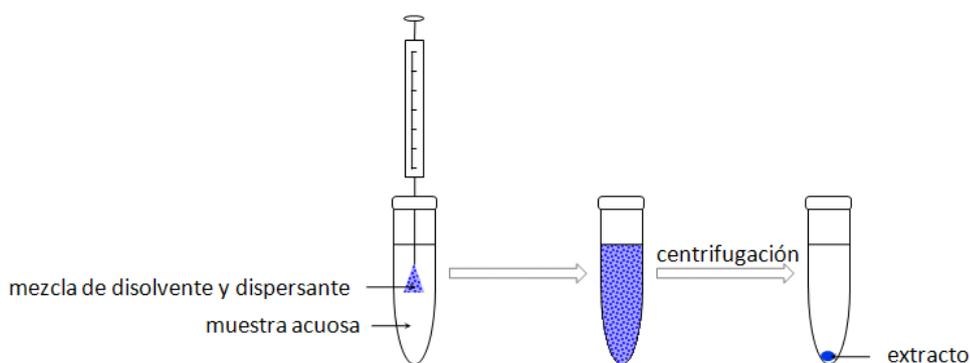


Figura 8. Esquema del procedimiento de DLLME

El empleo de una membrana de fibra hueca (HF-LPME)^{117,118} es otra alternativa a la tradicional LLE. Esta técnica consiste en introducir una membrana polimérica rellena y con sus poros impregnados con el disolvente que se va a utilizar como extractante. Esta membrana se introduce dentro de un vial que contenga la muestra acuosa. El disolvente extractante debe presentar gran afinidad por los analitos, ser inmisible con el agua y ser incapaz de atravesar las paredes de la membrana. Así, los analitos son transferidos a la fase orgánica que es posteriormente inyectada en el sistema cromatográfico. La *Figura 9* representa este sistema de forma esquemática. Esta técnica es sencilla, barata y no requiere instrumentación específica. Además, las membranas de fibra son desechables, por lo que no dará lugar a efectos de memoria y a problemas de contaminación cruzada. La HF-LPME proporciona factores de preconcentración relativamente altos, aunque no tanto como los que se pueden conseguir con otras

técnicas como la microextracción en fase sólida (SPME). La principal desventaja es que no es fácilmente automatizable.

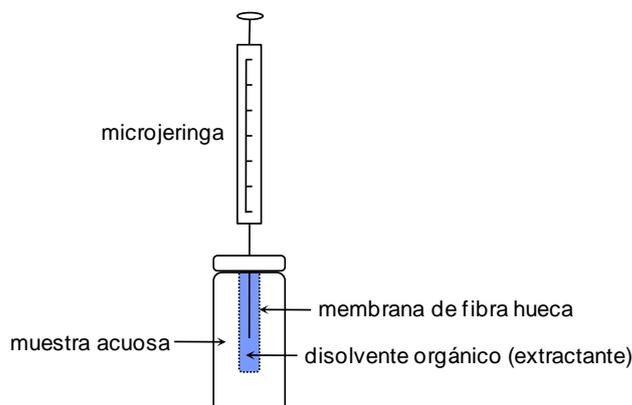


Figura 9. Esquema de un sistema HF-LPME

En la *Tabla 7* se recogen las características analíticas de algunas de las metodologías desarrolladas para la determinación de THMs en aguas empleando técnicas de preparación de muestra basadas en la LLE.

Tabla 7. Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que se basan en técnicas de LLE para la preparación de la muestra

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Extractante	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD (%)	Ref.
LLE-GC-MS	Agua potable (7 mL)	MTBE (0,5 mL)	0,02-0,2	< 27 ($40\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	119
HF-LPME GC-ECD	Agua de grifo y embotellada (10 mL)	1-octanol (25 μL)	0,01-0,1	< 6 ($1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	120
DI-SDME GC-ECD	Agua de grifo y de pozo (5 mL)	n-hexano (2 μL)	0,23-0,45	< 7 ($15\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	121
DLLME GC-ECD	Agua potable (5 mL)	CS_2 (20 μL)	0,005-0,04	< 6 ($2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	122
HS-SDME GC-MS	Agua de grifo, de pozo y de piscina (10 mL)	Hmim-PF ₆ * (2 μL)	0,5-0,9	< 11 ($\sim 75\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	123

* 1-hexil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (líquido iónico)

Espacio de cabeza estático (HS)

La técnica de espacio en cabeza estático (HS) se basa en la distribución de los analitos (solutos volátiles) entre la fase acuosa en la que se encuentran los analitos y una fase gaseosa. Para ello se pone la muestra en un vial, dejando en la parte superior un espacio para la fase gaseosa. Se cierra el vial herméticamente y a continuación se termostatiza y se presuriza dejando alcanzar el equilibrio entre las dos fases. A continuación, con una jeringa se toma una alícuota de la fase gaseosa en equilibrio con la muestra y se inyecta en el sistema cromatográfico.

Se trata de una técnica de preconcentración simple y reproducible que requiere poca manipulación de las muestras y que se puede automatizar con facilidad. Además se evita el uso de disolventes y, por tanto, la generación de este tipo de residuos. El HS ofrece recuperaciones aceptables para los THMs. Sin embargo los límites de detección obtenidos son más altos que los que se pueden obtener mediante otras técnicas de preconcentración, ya que la concentración del analito en el espacio de cabeza está en muchos casos por debajo del límite de detección de la técnica. La *Tabla 8* resume los trabajos publicados en los últimos años para la determinación THMs en distintos tipos de muestras acuosas mediante HS. El empleo de vaporizadores de temperatura programada (PTV) permite mejorar la sensibilidad del HS ya que, los analitos presentes en la fase gaseosa se preconcentran por efecto criogénico, de forma que se inyecta una mayor cantidad de muestra sin que aparezca el típico ensanchamiento de banda que tiene lugar al inyectar grandes volúmenes de muestra en HS.

Tabla 8. Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que se basan en la técnica de HS para la preparación de muestra

Configuración instrumental	Tipo de muestra	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD (%)	Ref.
HS-GC-ECD	Orina	0,03-0,05	< 15	124
HS-GC-MS	Agua potable (10 mL)	0,1	< 32 ($40\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	119
HS-GC-MS	Aguas de grifo, superficiales (río) y subterráneas	0,02-0,14	< 5 ($0,5\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	125
HS-GC-MS	Aguas de piscina, de grifo y de río	0,4-0,6	< 5 ($4\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	126
HS-GC-MS	Agua potable	0,5-0,7	< 5,5 ($10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	127
HS-GC-MS	Orina	0,003-0,01	< 6 ($0,2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	128
HS-GC-MS*	Agua de grifo, mineral y de pozo	0,0004-0,0026	< 5 ($1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	129
HS-GC-MS	Aguas recicladas	<0,21	< 8	130

* Con vaporizador de temperatura programada (PTV)

Purga y trampa (PT)

La técnica de purga y atrapamiento (PT) o espacio de cabeza dinámico consiste en hacer pasar a través de la muestra una corriente de gas inerte que arrastra los analitos volátiles. Posteriormente, los analitos quedan retenidos en una trampa que puede ser un adsorbente adecuado para las especies de interés o una trampa criogénica. Finalmente se lleva a cabo la desorción de los analitos mediante el calentamiento de la trampa. Normalmente estos sistemas incluyen una etapa de secado mediante sistemas de control de humedad para evitar que el vapor de agua desprendido de la purga de la muestra llegue a la trampa o a la columna, dando lugar a la distorsión de los picos cromatográficos. Las principales ventajas que ofrece esta técnica son su fiabilidad y su alta sensibilidad. Además no requiere el uso de disolventes orgánicos y es fácil de automatizar y acoplar en línea con un sistema de GC. En cuanto a sus desventajas, la PT es una técnica que requiere una instrumentación bastante compleja, y además la fibra empleada como adsorbente requiere un acondicionamiento tras cada análisis para

secar el sistema de control de humedad y evitar los efectos de memoria, lo que alarga considerablemente los tiempos de análisis.

A pesar de todo, la técnica de PT es una de las más utilizadas para la determinación de THMs, ¹³¹⁻¹³⁷ ya que es la técnica recomendada por varios organismos reguladores en sus métodos oficiales. En la *Tabla 9* se puede ver las características analíticas que presentan algunos métodos desarrollados para la determinación de THMs que basan su preparación de muestra en la técnica de PT.

Tabla 9. Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que se basan en la técnica de PT para la preparación de muestra

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Adsorbente	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD (%)	Ref.
PT-GC-MS	Agua potable (100 mL)	Carbón activo	1	< 30 ($2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	119
PT-GC-ECD	Efluentes de un vivero de marisco (5 mL)	VOCARB 4000	0,01-0,03	< 17	138
PT-GC-DELCD*	Agua potable	TENAX-GR	0,1-0,2	< 3	139
PT-GC-ECD	Agua potable	VOCARB 4000	0,01-0,03	< 17	140
PT-GC-MS	Agua potable	VOCARB 3000	0,02-0,7	< 4 ($25\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	141

* Detector de conductividad electrolítica seca (DELCD)

Microextracción en fase sólida (SPME)

La técnica de microextracción en fase sólida (SPME) consiste en introducir una fibra de sílice fundida recubierta por una fase estacionaria adecuada en la muestra acuosa (inmersión directa, DI-SPME) o en la fase gaseosa con la que se encuentra en equilibrio (espacio de cabeza, HS-SPME) hasta que se establece el equilibrio entre el analito en la muestra y en la fibra (etapa de extracción o muestreo). A continuación se introduce la fibra en el inyector del cromatógrafo de modo que los analitos son desorbidos térmicamente (etapa de desorción) y posteriormente separados. El empleo de esta técnica presenta varias ventajas ya que es bastante sencilla, fácilmente automatizable y

no demasiado cara y, además, no requiere el uso de disolventes orgánicos. Como desventaja destaca su baja reproducibilidad. Los límites de detección y las recuperaciones obtenidos con esta técnica van a depender en gran medida de la fibra seleccionada (tipo de recubrimiento y espesor) y de las condiciones de trabajo (temperatura y tiempo de extracción, efecto salino, pH de la muestra, volumen de muestra, volumen del espacio de cabeza, agitación de la muestra y forma del vial, adición de un disolvente y derivatización), que deben ser previamente optimizadas. Esta técnica resulta muy útil para la preconcentración de compuestos volátiles y semivolátiles y se ha utilizado ampliamente para la determinación de THMs en aguas, trabajando mayoritariamente en el modo de espacio de cabeza.

Una alternativa a esta técnica es la extracción sortiva con barra de agitación (SBSE)¹⁴² en la que la fase estacionaria que extrae los analitos, que en este caso suele ser polidimetilsiloxano (PDMS), se deposita sobre una barra agitadora en lugar de ser depositada sobre una fibra de sílice desactivada. La principal ventaja que ofrece esta técnica cuando se compara con la de SPME es que la barra agitadora permite depositar una mayor cantidad de fase estacionaria que la fibra, por lo que el factor de preconcentración aumentará consiguiendo una sensibilidad entre 100 y 1000 veces superior. Además se trata de una técnica fácilmente automatizable. Como desventajas se puede destacar que este sistema requiere un sistema de desorción térmica, como PTV, para que los analitos puedan ser extraídos de la fase estacionaria en la que han sido retenidos e introducidos en la columna de GC, lo que hace que la implementación de esta técnica resulte un tanto cara. Posiblemente por este motivo existen pocos trabajos hasta el momento en los que SBSE haya sido utilizada para el control de THMs en aguas a pesar de tratarse de una técnica muy adecuada para la extracción de compuestos volátiles presentes en muestras acuosas a bajos niveles de concentración.¹⁴³

La *Tabla 10* recoge los trabajos desarrollados en los últimos años que emplean la técnica de SPME, tanto en el modo DI-SPME como HS-SPME, para la determinación de THMs en muestras acuosas.

Tabla 10. Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que se basan en la técnica de SPME para la preparación de muestra

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Fibra	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD (%)	Ref.
HS-SPME-GC-MS	Aguas de grifo y de río	PDMS (100 μm)	0,01-0,02	< 4,5 (0,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	144
HS-SPME-GC-ECD	Agua potable	CAR-PDMS (85 μm)	0,0003-0,001	< 2,6	145
DI-SPME-GC-MS	Agua potable	PDMS (100 μm)	0,1-0,2	< 11	146
HS-SPME-GC-MS	Agua potable (10 mL)	PDMS-DVB	0,0004-0,006	< 4 (9,60 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	147
DI-SPME-GC-MS	Agua potable	DVB-CAR-PDMS (50/30 μm)	0,02-0,7	< 4 (25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	141
HS-SPME-GC-MS	Agua potable, superficial y efluentes industriales	CAR-PDMS (75 μm)	0,13-0,17	< 13 (1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	148
HS-SPME-GC-ECD	Agua potable	PDMS (100 μm)	0,001-0,006	< 12	149
HS-SPME-GC-ECD	Refrescos	CAR-PDMS (75 μm)	0,2-0,5	< 12 (1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	150

Inyección acuosa directa (DAI)

La inyección acuosa directa (DAI) no es en sí un método de preparación de muestra sino que es un modo rápido y natural de introducir una muestra de agua en un sistema de GC. La inyección directa de muestras acuosas en columnas de GC no es muy recomendable debido a que el agua deteriora su recubrimiento. Sin embargo, resulta de gran utilidad para la determinación de compuestos muy volátiles en muestras de agua, siempre que se trate de muestras limpias. Para poder emplear esta metodología es necesario recubrir las columnas de GC con una capa de un líquido apolar que hace que el agua eluya antes que los analitos. Además se utiliza un inyector “on-column” que se mantiene frío, de forma que la muestra se introduce directamente en la columna sin

que haya sido previamente vaporizada y evitando por tanto la pérdida de analitos volátiles. La principal ventaja que ofrece esta técnica es que requiere una manipulación de la muestra mínima, por lo que la probabilidad de perder los analitos por volatilidad o de que surjan problemas de contaminación cruzada se reduce notablemente. Otra ventaja adicional es que no requiere el uso de disolventes orgánicos con lo que se evitan los problemas derivados de su uso. Además, se puede automatizar con facilidad. Una de las desventajas de este modo de inyección es que se produce un deterioro del segmento inicial de la columna, debido a la presencia de compuestos orgánicos no volátiles y sales inorgánicas en las muestras acuosas analizadas, por lo que se suele recurrir a precolumnas o guardacolumnas para reducir al mínimo este problema. Además, esta metodología está limitada a aquellas muestras que contengan concentraciones de analitos suficientemente elevadas como para estar por encima de los límites de detección (LD) de la técnica analítica empleada, ya que no se realiza ningún tipo de preconcentración de los analitos.

La DAI en GC ha sido empleada en algunas ocasiones para la determinación de THMs en aguas.¹⁵¹ En la *Tabla 11* se pueden ver las características analíticas que ofrece esta técnica.

Tabla 11. *Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos con DAI de la muestra*

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Volumen inyectado (μL)	LD (μg · L ⁻¹)	RSD (%)	Ref.
DAI-GC-ECD	Agua potable, de piscina y destilada	4	0,3-0,4	< 3 (15 μg · L ⁻¹)	152
DAI-GC-ECD	Agua de lluvia	2-5	-	-	153
DAI-GC-ECD	Aguas industriales y residuales	2	0,014-0,05	< 3,5 (1 μg · L ⁻¹)	154
DAI-GC-MS	Aguas subterráneas y de río	10	0,07-0,13*	< 10*	155

* Sólo para CF

Muestreadores de membrana

Por último, se han desarrollado algunas técnicas para la monitorización en línea para los THMs. La mayoría de estas técnicas se basan en el empleo de dispositivos portátiles que constan de una membrana permeable a los analitos, a través de la cual se hace pasar la muestra. Así, los analitos serán preconcentrados y posteriormente introducidos en sistema cromatográfico, mediante un proceso denominado pervaporación, para su separación y detección. La principal ventaja que ofrece esta técnica es que permite conocer la concentración de THMs en aguas en tiempo real. La *Tabla 12* recoge las características analíticas de los principales trabajos dedicados al desarrollo de este tipo de técnicas.

Tabla 12. *Técnicas de monitorización de THMs en línea*

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Membrana	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD (%)	Ref.
SCMS-GC-PDPID ^a	Agua potable	Silicona	0,16-1,3	< 7 ($6,7\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	156
CMS-GC-ECD ^b	Agua potable	Silicona	0,3-0,5	< 8,6 ($1,8\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	157
GEC-GC-DELCD ^c	Agua potable	Silicona	0,1-0,8	<2,8 ($1,7\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	139

^a Muestreador capilar de membrana sobre un soporte. (SCMS). Detector de fotoionización de descarga pulsada (PDPID).

^b Muestreador capilar de membrana (CMS).

^c Celda de extracción de gas (GEC). Detector de conductividad electrolítica seca (DELCD).

A.2.1.2 Métodos de preparación de muestra para la determinación de PBDEs en muestras biológicas y medioambientales

Los PBDEs presentan propiedades fisicoquímicas semejantes a las de otros POPs como los PCBs, por lo que los métodos de preparación de muestra se basan principalmente en las metodologías que habían sido desarrolladas anteriormente para la determinación de PCBs. Como ocurre con los PCBs, los PBDEs suelen encontrarse a bajos niveles de concentración en muestras muy variadas y complejas de origen biológico y medioambiental. Por tanto el procedimiento de preparación de muestra no será tan sencillo como llevar a cabo una simple extracción sino que requerirá, en

muchos casos, de etapas adicionales de limpieza y fraccionamiento de los extractos, con objeto de separar las sustancias que hayan podido ser extraídas junto con los analitos y que puedan interferir o provocar problemas en las etapas finales del análisis así como de preconcentración de los analitos para que alcancen niveles de concentración medibles por el sistema de detección seleccionado.

A.2.1.2.1 Pretratamiento de muestra

Antes de llevar a cabo la extracción de los analitos, la muestra debe estar perfectamente homogeneizada para que el submuestreo pueda ser realizado adecuadamente. Esta etapa resulta relativamente sencilla cuando se trabaja con muestras líquidas que pueden ser homogenizadas fácilmente por agitación¹⁵⁸ o por inmersión en baño de ultrasonidos,¹⁵⁹ de modo que el único pretratamiento de muestra necesario será el filtrado.¹⁶⁰⁻¹⁶⁵ Sin embargo, cuando se trabaja con muestras líquidas de origen biológico puede ser necesario someterlas a algún otro tipo de pretratamiento adicional, como por ejemplo la desnaturalización de proteínas para asegurar que los analitos son completamente liberados de la matriz de la muestra y mejorar así la eficiencia de extracción.^{159,166,167}

Sin embargo, cuando se trata de muestras sólidas o semisólidas resulta más difícil asegurar su homogeneidad. Para ello se suele someter a estas muestras a unas etapas de secado, molienda y tamizado previas a la extracción de los analitos.

La eliminación del agua de las muestras favorece la accesibilidad de los disolventes orgánicos, facilitando así el proceso de extracción de los analitos. En la bibliografía se pueden encontrar varios métodos para el secado de las muestras. En algunos casos la muestra se deja secar al aire, bien a temperatura ambiente¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ o bien calentándola ligeramente en una estufa.^{171,172} En este caso debe prestarse especial atención a la posible pérdida de analitos o incorporación de otras sustancias desde el entorno, así como a los posibles problemas de contaminación cruzada. Otra alternativa es la liofilización de las muestras.^{35,103,173-184} Con este método se consigue un secado más rápido y se evitan los problemas del secado al aire. Finalmente, el secado químico consiste en mezclar la muestra con la cantidad necesaria de una sustancia química que sea capaz de enlazar y retener el agua presente en ella.¹⁸⁵⁻¹⁹² El principal problema que presenta este método de secado es que la muestra se puede contaminar con facilidad si el agente desecante no está perfectamente limpio, por lo que es necesario lavarlo con

disolventes y calentarlo a altas temperaturas (~400°C) antes de ser utilizado y conservarlo en un recipiente hermético.

A.2.1.2.2 Extracción de la muestra

Los procedimientos de extracción de muestra dependerán en gran medida del tipo de matriz desde la que haya que extraer los analitos. Así se recurrirá a distintas técnicas de extracción dependiendo de si la muestra es líquida o sólida.

Muestras líquidas

Dentro del grupo de muestras líquidas se incluyen tanto muestras de origen biológico, como suero u orina, como las procedentes de otros compartimentos medioambientales, como aguas limpias, aguas residuales o lixiviados de vertederos. También se consideran muestras líquidas aquellas que se puedan poner en disolución con facilidad, como algunos polímeros solubles que se hayan empleado en el muestreo de aire.

La extracción de PBDEs desde matrices acuosas se ha llevado a cabo frecuentemente mediante la clásica LLE. A pesar de emplear grandes volúmenes de disolventes y ser un procedimiento muy laborioso, es por su sencillez uno de los procedimientos recomendados por la EPA (método 1614) para la extracción de PBDEs en muestras acuosas de origen medioambiental. Sin embargo, los PBDEs suelen encontrarse a niveles muy bajos de concentración en aguas, debido a su carácter hidrofóbico, lo que obliga al empleo de grandes volúmenes de disolventes para la extracción. Al igual que ocurría con los HVOCs también se han desarrollado para los PBDEs métodos alternativos basados en la técnica de LLE que tienden a minimizar los volúmenes de disolvente empleados y facilitan la automatización de la etapa de extracción. En la *Tabla 13* se puede ver un resumen de algunos trabajos que se basan en la LLE para la extracción de PBDEs en muestras acuosas, junto con sus características analíticas. Como se puede observar ya se han desarrollado varios métodos basados en la LPME. Las técnicas de HF-LPME y DLLME ya han sido descritas en la sección A.2.1.1.

La microextracción en fase líquida mediante emulsión asistida por ultrasonidos (USAEME) se basa en la SDME (descrita en A.2.1.1) pero en este caso, la microgota, en lugar de quedar suspendida sobre la aguja, es dispersada por toda la muestra mediante la acción de ultrasonidos. Así se forma una emulsión que acelera y favorece la

transferencia de los analitos hacia la fase orgánica. La USAEME presenta las mismas ventajas que SDME resultando además más reproducible y evitando los problemas derivados de la inestabilidad de la gota.

Tabla 13. Características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que se basan en técnicas de LLE para la preparación de la muestra

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Extractante	LD (ng L ⁻¹)	RSD (%)	Ref.
LLE-GC-HRMS	Suero bovino (10 g)	Acetato de etilo (20 mL)	< 0,5 (ng·kg ⁻¹)	5-15	193
HF-LPME-GC-MS	Agua de grifo, de río y lixiviados de vertedero (100 mL)	n-undecano (22 µL)	0,2-0,9	< 11 (10ng·L ⁻¹)	194
HF-LPME-GC-(ICP)MS	Agua de lago (3 mL)	Decano (4 µL)	< 40	< 10	195
DLLME-HPLC-UV	Agua de grifo, de río y lixiviados de vertedero (5 mL)	CH ₂ Cl ₄ (20 µL)	< 55	< 6 (50-100 ng·L ⁻¹)	160
USAEME ^a -GC-MS	Agua de grifo, de lago y de río (10 mL)	CHCl ₃ (100 µL)	1-2	< 11	161
CPE-UABE ^b -GC-MS	Agua de grifo, de lago y de río (10 mL)	Isooctano (50 µL)	1-2	< 9	196

a Microextracción en fase líquida mediante emulsión asistida por ultrasonidos (USAEME).

b Extracción por punto de nube asistida por ultrasonidos (CPE-UABE).

La extracción por punto de nube asistida por ultrasonidos (CPE-UABE) es semejante a la anterior, pero consta de dos etapas. En una primera etapa la muestra se mezcla con un tensoactivo no iónico de modo que, cuando la temperatura alcanza el punto de nube, aumentará la afinidad de los analitos por los agregados micelares del tensoactivo. Por encima del punto de nube se separan ambas fases de modo que los analitos quedan en la fase micelar que se deposita en el fondo del tubo. Esta fase se separa por centrifugación y se extrae con un pequeño volumen de disolvente. Como ocurre con USAEME la extracción es asistida por ultrasonidos para favorecer el paso de los analitos a la fase orgánica. CPE-UABE es una técnica de preparación de muestra barata, sencilla y respetuosa con el medioambiente.

La técnica de extracción en fase sólida (SPE) también se ha empleado mucho para la extracción de contaminantes orgánicos desde muestras líquidas, especialmente para muestras de origen biológico, como sangre o leche. Para extraer las muestras mediante SPE se utilizan columnas o cartuchos rellenos con un material adsorbente sólido. La muestra se hace pasar por el cartucho de extracción de forma que los analitos son adsorbidos en el soporte y luego eluidos de acuerdo a sus diferentes afinidades entre el material adsorbente y la fase móvil utilizada. Las principales ventajas que presenta este método de preparación de muestras frente a otros como LLE es que reduce el consumo de disolventes y el tiempo de procesado de muestra, mejora la reproducibilidad y es fácil de miniaturizar y automatizar. También permite el procesado de muestras de tamaños muy variados y permite alcanzar elevados factores de preconcentración. Otra ventaja adicional es que, en algunos casos, la SPE permite llevar a cabo los procedimientos de extracción y limpieza en un solo paso siempre que la muestra no contenga grandes cantidades de lípidos. Además es rápida, económica y minimiza el riesgo de pérdida o contaminación de la muestra. Por todo ello, es uno de los métodos recomendados por la EPA (métodos 527 y 1614) para la extracción de PBDEs en muestras acuosas. En la *Tabla 14* se resumen las características analíticas y el tipo de adsorbente que se emplean en algunos de los métodos desarrollados en los últimos años para la determinación de PBDEs en muestras líquidas. Los disolventes empleados con más frecuencia para la elución de los PBDEs son tolueno, diclorometano y mezclas de diclorometano con un disolvente apolar como n-hexano.

Tabla 14. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs mediante distintos métodos de SPE para la preparación de muestras líquidas

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Adsorbente	LD	RSD (%)	Ref.
SPE-GC-MS	Suero humano (10 mL)	OASIS® HLB	0,2-25 ng·L ⁻¹	< 17	158
SPE-GC-MS	Plasma humano (8 mL)	Isolute ENV +	0,0076-0,13 ng·g ⁻¹	< 6 (10ng·g ⁻¹)	166
SPE-GC-MS	Suero humano (0,5-1 mL)	OASIS® HLB	6-80 fg	< 12 (10-100 ng·mL ⁻¹)	197
SPE-GC-MS	Suero humano (5 g)	OASIS® HLB	0,2-1,8 pg·g ⁻¹	< 11	159
SPE-PTV-GC-MS/MS	Suero humano (1 mL)	OASIS® HLB	--	< 17	198
SPE-GC-MS	Agua de lluvia y nieve (1-10 L)	Empore C18	2,1-10 pg·L ⁻¹	< 25	199
SPE-GC-MS	Agua residual doméstica, industrial y aguas subterráneas (50 mL)	OASIS® HLB	0,4-375 ng·L ⁻¹	< 18	200
SPE-LC-APPI-MS/MS ^a	Agua potable, de río y residuales (1 L)	Carbograph 1	0,2-11 ng·L ⁻¹	< 13	163
SPE-GC-MS	Agua de río	C18+SAX/MAX	3-150 pg·L ⁻¹	< 13	164
SPE-GC-MS	Suero de oveja (1 g)	Strata-X	47-105 pg·g ⁻¹	< 11	167

^aFotoionización a presión atmosférica (APPI) en modo negativo

Otra alternativa para la extracción de muestras líquidas son las técnicas de SPME y SBSE (descritas en la sección A.2.1.1). La *Tabla 15* resume los principales trabajos recogidos en la bibliografía en los que se lleva a cabo la determinación de PBDEs en muestras acuosas utilizando las técnicas de SPME o SBSE en las etapas de extracción y preconcentración de los analitos. Como se puede observar las fibras de SPME

comerciales apenas se han utilizado para la extracción de los PBDEs ya que no proporcionan eficiencias de extracción demasiado buenas. Por ello, se tiende a recurrir a la técnica de SBSE que proporciona rendimientos de extracción mucho mejores, o al desarrollo de nuevos recubrimientos que permitan mejorar este aspecto.

Tabla 15. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs mediante distintos métodos de SPME y SBSE para la preparación de muestras líquidas

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Fibra	LD (ng L ⁻¹)	RSD (%)	Ref.
DI-SPME-GC-ECD	Agua de río y efluentes industriales (10 mL)	MWCNTs ^a	3,6-8,6	< 9 (500 ng·L ⁻¹)	201
SBSE-LD-LVI-GC-MS ^b	Aguas residuales (30 mL)	PDMS	0,4-204	< 10 (5 µg·mL ⁻¹)	202
SBSE-TD-GC-MS ^c	Agua de mar y de estuario (20 mL)	PDMS	0,03-1,7	< 6,2 (100 ng·L ⁻¹)	165
SBSE-TD-GC-MS ^c	Agua de mar (20 mL)	PDMS	0,2-1,9	< 11 (200 ng·L ⁻¹)	203
HS-SPME-GC-ECD	Aguas de embalse y residuales (10 mL)	SWCNTs/TSO-OH ^d	0,08-0,8	< 7,5 (50 ng·L ⁻¹)	204
HS-SPME-GC-µECD/FID	Agua de río (10 mL)	PFOS- doped PANI ^e	0,1-0,2	< 8,5 (50 ng·L ⁻¹)	205

^a Nanotubos de carbono multipared (MWCNTs)

^b Desorción líquida con inyector de grandes volúmenes (LD-LVI)

^c Desorción térmica (TD)

^d Nanotubos de carbono monopared (SWCNTs) funcionalizados con aceite de silicona con grupos hidroxilo terminales (TSO-OH)

^e Polianilina (PANI) dopada con ácido perfluorooctanosulfónico (PFOS)

Muestras sólidas

La etapa de extracción de muestras sólidas se suele llevar a cabo mediante un proceso de extracción sólido-líquido (lixiviación) en el que los contaminantes son transferidos a un disolvente orgánico. La extracción, en general, se lleva a cabo por contacto directo del disolvente extractante con la muestra sólida finamente pulverizada. Para mejorar el rendimiento del proceso de extracción se suele recurrir a distintas estrategias, como la agitación de la mezcla muestra-extractante, el aumento en la temperatura y/o presión

del disolvente de extracción o la aplicación de microondas o ultrasonidos. En la *Tabla 16* aparecen recogidos los trabajos que recurren a este sistema de extracción.

Tabla 16. *Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs mediante SLE para la preparación de muestras sólidas*

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Disolvente	LD (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Ref.
SLE-GC-MS	Tejido mamario humano (1 g)	n-hexano (15 mL)	0,006-2	< 16 (1 ng·g ⁻¹)	185
SLE-GC-MS	Tejido muscular de animales acuáticos (1 g)	Acetona (10 mL)	2,4-4,9	< 10 (10 ng·g ⁻¹)	173
SLE-GC-MS	Pescado (5 g) y aceite de pescado (1 g)	n-hexano/acetona (1:1)	5-105 (pg)	< 40	186

La extracción Soxhlet es la metodología más ampliamente utilizada para la extracción de POPs desde muestras sólidas. Para llevar a cabo este tipo de extracción, la muestra sólida seca y finamente pulverizada se coloca en un cartucho poroso que se sitúa en el cuerpo del extractor. El disolvente extractante, situado en un matraz bajo el cuerpo de extracción, se calienta hasta que sus vapores caen por condensación sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral del cuerpo de extracción, el disolvente, con los analitos disueltos, desciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra. Esta técnica de extracción es un proceso bastante lento y difícil de automatizar y además requiere el uso de grandes volúmenes de disolventes. Sin embargo, sigue siendo muy utilizado debido a su simplicidad, a que es posible llevar a cabo la extracción de varias muestras en paralelo y a que es aplicable a un amplio rango de contaminantes lipofílicos y en gran variedad de matrices por lo que se considera el método de extracción de referencia para los POPs. Esta técnica se ha empleado para la extracción de PBDEs tanto en muestras sólidas de origen biológico (e. g. leche y distintos tipos de tejidos), como en muestras de origen

medioambiental (e. g. sedimentos, suelos o polvo doméstico) y es la técnica de extracción recomendada por el método oficial de la EPA 1614.

La *Tabla 17* recoge los principales trabajos desarrollados durante los últimos años que emplean la técnica Soxhlet para la extracción.

Tabla 17. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs mediante SE para la preparación de muestras sólidas

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Disolvente	LD (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Ref.
SE-GC-MS/MS	Suelos y sedimentos (4 g)	Hexano/acetona (1:1)	0,013-0,25 (peso seco)	< 36 (1,25 ng·g ⁻¹)	187
hotSE-GC-MS	Sedimento (1 g)	Hexano/acetona (3:1)	0,05-0,2 (peso seco)	< 15	168
SE- GC-HRMS	Músculo y tejido de pescado (20-50 g)	Hexano/diclorometano (1:1)	0,01-0,13 (peso lípido)	< 16 (16-40 pg·g ⁻¹)	174
SE-GC-MS/MS	Pescado (1-5 g)	Diclorometano/acetona (1:1)	--	< 10	175
SE-HRGC-HRMS	Gases de combustión	Diclorometano	0,020-3,71 (ng·mL ⁻¹)	< 5,5 (50 ng·mL ⁻¹)	206
SE-GC-MS	Suelo, vegetación, polvo y residuos de componentes electrónicos (20 g)	Diclorometano/hexano (3:1)	0,005-0,35	--	169
SE-HRGC-HRMS	Aire ambiental	Tolueno	0,262-333 (pg)	< 32	207

Una variante de la extracción Soxhlet (SE) es la denominada Soxhlet caliente (hotSE), en la que el disolvente es destilado en la propia cámara de extracción, la cual se calienta por debajo del punto de ebullición del disolvente de forma que la muestra está en contacto permanente con el disolvente caliente. Así se aceleran los procesos de desorción y de extracción de los analitos. La principal ventaja de la técnica de Soxhlet caliente es que permite obtener eficiencias de extracción del orden de las obtenidas

mediante su versión clásica pero reduciendo considerablemente los tiempos de extracción.

La extracción con líquidos presurizados (PLE) es uno de los métodos más empleados para la extracción de PBDEs y sus derivados. Funciona de forma semejante al sistema de extracción Soxhlet, pero en este caso los disolventes están en un estado próximo al supercrítico. Las altas temperaturas alcanzadas por el disolvente mejoran la solubilidad de los analitos y favorecen su difusión hacia el disolvente mientras que las altas presiones mantienen al disolvente en estado líquido, mejorando así su capacidad de extracción. En estas condiciones, los disolventes impregnan mejor las muestras sólidas, permitiendo llevar a cabo la extracción de forma rápida y eficiente, con un gasto mínimo de disolventes, proporcionando resultados comparables a los obtenidos mediante SE en términos de recuperaciones.¹⁸¹ Otra de sus ventajas es que, en algunos casos, es posible llevar a cabo los procesos de extracción y limpieza en una sola etapa. Las principales desventajas que presenta esta técnica de extracción son que las celdas deben ser limpiadas cuidadosamente antes de reutilizarlas para extraer más muestras ya que si no es así pueden surgir problemas de contaminación cruzada y que requiere una instrumentación especial. La *Tabla 18* recoge las características analíticas de algunos trabajos llevados a cabo en los últimos años en los que se emplea la técnica de PLE en la etapa de extracción de los PBDEs.

Tabla 18. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs empleando PLE para la extracción de los analitos en muestras sólidas

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Disolvente	LD (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Ref.
PLE-GC-MS	Sedimentos y pescado (1 g)	Hexano/diclorometano (1:1)	0,013-0,25 (peso húmedo)	< 13 (1,25 ng·g ⁻¹)	176
PLE-GC-MS	Grasa de ballena (1,5 g)	Diclorometano	0,5-1,0 (peso húmedo)	< 20	188
PLE-GC-MS	Leche materna (1 g)	Hexano/diclorometano (1:1)	0,01-0,05 (peso húmedo)	< 14 (20 ng·mL ⁻¹)	177
PLE-GC-MS	Tejido de mejillón y sedimento marino (1,8 g)	Diclorometano	0,05-0,25	< 12	35
PLE-LC-MS/MS	Polvo	Hexano/diclorometano (1:9)	12-30 (pg)	< 10	208
PLE-UPLC-MS/MS ^a	Lodos residuales (5 g)	Tolueno	0,010-0,66	< 20	178
PLE-GC-MS/MS	Pescados (0,5 g)	Hexano/diclorometano (9:1)	0,015-0,053 (peso húmedo)	< 13 (20 ng·mL ⁻¹)	179
PLE-GC-MS/MS	Pescados y mariscos (0,5 g)	Hexano/diclorometano (9:1)	0,001-0,016 (peso húmedo)	< 16	180
PLE-GC-MS	Suelos (1 g)	Diclorometano	0,011-0,054	< 7 (10 ng·g ⁻¹)	209
PLE-GC-MS	Tejido de hígado de oveja (0,8 g)	Isohexano/diclorometano (9:1)	0,005-0,096	< 9	181
PLE-GC-MS	Sedimentos (20 g) y SPM ^b (5 g)	n-hexano/acetona (3:1)	0,02 ^c	2 (2,5 ng·g ⁻¹) ^c	182

^a Cromatografía líquida de ultra alta eficacia (UPLC)

^b Material particulado en suspensión

^c Sólo para el congénere 209

La energía de microondas también ha sido empleada para favorecer el paso de los analitos desde la matriz sólida hacia el disolvente orgánico, dando lugar a la técnica denominada extracción asistida por microondas (MAE). Esta técnica de extracción

resulta muy sencilla ya que solamente requiere poner la muestra seca y finamente pulverizada junto con el extractante en una bomba de microondas y someter la mezcla a la acción de las microondas, las cuales aumentan la presión y temperatura del disolvente favoreciendo la extracción. Sin embargo, en cuanto a la instrumentación, la MAE requiere el empleo de un equipo de microondas, por lo que no es tan accesible como el sistema SE. La MAE permite la extracción simultánea de varias muestras, pero presenta alguna limitación, ya que el extractante debe ser un disolvente polar que sea capaz de absorber la radiación de las microondas y resulta difícil de automatizar y acoplar en línea a las técnicas de análisis. Para extraer los analitos mediante MAE generalmente es necesario llevar a cabo la optimización de ciertos parámetros de extracción como el tipo y naturaleza del disolvente, la temperatura y el tiempo de extracción. Cuando se trabaja en condiciones óptimas se pueden obtener resultados comparables a los obtenidos mediante SE y sin degradación de las especies más lábiles. La *Tabla 19* recoge los trabajos desarrollados durante los últimos años que emplean la MAE para la extracción de los PBDEs de matrices sólidas junto con sus características analíticas.

Tabla 19. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs empleando MAE para la extracción de los analitos en muestras sólidas

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Disolvente	LD (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Ref.
MAE-GC-MS	Tejido adiposo (0,5 g)	n-hexano/diclorometano (1:1)	0,5-1,2 (peso lípido)	< 5 (5 ng·g ⁻¹)	189
MAE-PTV-LVI-GC-MS/MS	Sedimentos marinos (1 g)	Hexano/acetona (1:1)	0,004-0,02 (peso seco)	< 13 (10 ng·g ⁻¹)	183
MAE-GC-MS/MS	Polvo (0,8 g)	n-hexano/NaOH 10% (2:1)	0,29-0,55	< 15	210
MAE-GC-MS	Lodos residuales (0,25-0,5 g)	Hexano/acetona (3:1)	1,6-6,1 (peso seco)	< 2 (20ng·g ⁻¹)	190
MAE-GC-μECD	Polvo (0,8 g)	n-hexano/NaOH 10% (2:1)	0,07-1,44 (pg)	< 13	191
MAE-GC-MS/MS	Pescado (1 g)	Hexano/diclorometano (1:1)	0,67-1,36	< 15	211
MAE-GC-MS	Polímeros de equipamiento electrónico (0,3 g)	Hexano/agua (2:1)	0,18-68,2 (peso húmedo)	< 9 (5 ng·mL ⁻¹)	212

Los ultrasonidos también pueden facilitar la etapa de extracción de los analitos de la matriz de la muestra gracias a los incrementos locales de energía que se producen en la mezcla muestra-extractante sometida a la acción de este tipo de ondas. Los incrementos locales de temperatura van a favorecer la solubilidad en ese punto, mientras que los incrementos de presión van a favorecer la penetración del disolvente en el sólido y la formación de un medio reactivo que ataque a la muestra. La principal ventaja que ofrece la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) es su sencillez, ya que para el proceso de extracción solamente el necesario mezclar la muestra con el extractante y someterlo a ultrasonidos mediante baños o sondas. Además la instrumentación es muy sencilla y permite acelerar el proceso de extracción frente a otras técnicas como la SE. La *Tabla 20* resume las características analíticas de algunos trabajos que emplean UAE como técnica de extracción en la determinación de PBDEs.

Tabla 20. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs empleando UAE para la extracción de los analitos en muestras sólidas

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Disolvente	LD (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Ref.
UAE-GC-MS	Suelos	Acetato de etilo	0,003-0,03	< 12 (5 ng·g ⁻¹)	213
UAE-GC-MS/MS	Lodos residuales, sedimentos y suelos (2 g)	Hexano	0,01-1,2 (peso seco)	< 13 (2,5 ng·g ⁻¹)	171
UAE-GC-MS	Polímeros de equipamiento electrónico (5 g)	Diclorometano, xileno o fenol/CCl ₄ (1:1)	5 (mg·kg ⁻¹)	< 4,3	214
UAE-PTV-GC-MS	Polímeros (25 mg)	Tolueno	1,3-5,6 (ng·mL ⁻¹)	< 18 (0,09% Br)	215
UAE-HPLC-(ICP)MS	Polímeros	Tolueno	5,90-7,55 (mg·kg ⁻¹)	< 5,4	216
UAE-GC-MS/MS	Sedimentos de río y de lago (0,25 g)	Acetona	0,02-0,06	< 9,8	172
UAE-GC-MS/MS	Pescado, pollo y huevos (1 g)	n-hexano/diclorometano (8:2)	0,009-0,044	< 11 (5 ng·mL ⁻¹)	192

La dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) es una técnica en la cual la muestra se mezcla con un agente dispersante en un mortero (generalmente un adsorbente con base de sílice), de forma que la fuerza aplicada en el proceso de molienda rompe la estructura de la muestra y da lugar a la dispersión de la misma sobre la superficie del soporte sólido mediante interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Así resultará más fácil liberar los analitos de la matriz de la muestra, ya que una vez dispersada sobre el soporte sólido, será un polvillo suelto, homogéneo y semiseco que se empaqueta en una columna de SPE. De ahí los analitos serán eluidos mediante un disolvente apropiado, mientras que los interferentes serán retenidos selectivamente en la columna. Esta técnica permite llevar a cabo la extracción de los analitos de la matriz de la muestra de forma rápida y sencilla, empleando mínimas cantidades de disolventes. Además, permite extraer y purificar los analitos en un solo paso. A pesar de las ventajas que presenta esta técnica, no ha sido muy empleada hasta la fecha ya que en

algunos casos se ha demostrado que la extracción no es tan eficiente como con otras técnicas, aunque se puede mejorar mediante la aplicación de ultrasonidos.^{184,217}

Tabla 21. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs empleando MSPD para la extracción de los analitos en muestras sólidas

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Disolvente	LD (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Ref.
MSPD-GC-MS/MS	Pescado (3 g)	Hexano/diclorometano (1:1)	0,001-0,170 (peso húmedo)	< 22 (10 ng·g ⁻¹)	184

Por último, la técnica de SPME (sección A.2.1.1) también ha sido empleada en alguna ocasión para la extracción de PBDEs de muestras sólidas medioambientales, como por ejemplo en suelos, sedimentos o lodos residuales. Para ello se añade una cantidad de agua sobre las muestras secas y la fibra se expone en espacio de cabeza. La principal ventaja que presenta es que en un solo paso se pueden llevar a cabo las etapas de extracción, limpieza, fraccionamiento y preconcentración, por lo que permite reducir considerablemente el tiempo de análisis. La *Tabla 22* recoge los trabajos que emplean esta técnica de extracción junto con sus características analíticas.

Tabla 22. Características analíticas obtenidas en la determinación de PBDEs empleando SPME para la extracción de los analitos en muestras sólidas

Configuración instrumental	Tipo de muestra	Fibra	LD (ng g ⁻¹)	RSD (%)	Ref.
HS-SPME-GC-MS/MS	Sedimentos, suelos y lodos residuales (0,5 g)	PDMS (100µm)	0,005-0,625	< 10 (1 ng·g ⁻¹)	218
HS-SPME-GC-MS	Suelos (1 g)	PM-β-CD/OH-TSO	0,013-0,078	< 10 (1 ng·g ⁻¹)	170
HS-SPME-GC-MS/MS	Sedimentos (0,25-0,5 g)	PA (85 µm) ^b	0,05-0,50 (ng·mL ⁻¹)	< 6,2 (10 ng·mL ⁻¹)	103

^a β-cilodextrina permetilada (PM-β-CD)

^b Poliacrilato (PA)

A.2.1.2.3 Limpieza y fraccionamiento de los extractos

La etapa de extracción es un proceso no selectivo en el que, junto con los analitos, se pueden co-extraer cantidades elevadas de otras sustancias presentes en la matriz de la muestra que pueden interferir en la separación y/o determinación final de los PBDEs, por lo que, en general, es necesario someter a los extractos crudos a procesos de limpieza y fraccionamiento. Las etapas de limpieza y fraccionamiento de los extractos son un paso crítico y muy importante dentro de todo el proceso de preparación de muestra. Estas etapas suelen ser, en general, largas y tediosas y conllevan una gran manipulación de la muestra, ya que en muchos casos es necesario someter los extractos de la muestra a varios de estos procedimientos.

Eliminación de lípidos

Los extractos de muestras biológicas suelen contener altas concentraciones de lípidos que deben ser eliminados previamente a la separación cromatográfica de los PBDEs. La eliminación de los lípidos puede llevarse a cabo mediante métodos destructivos o no destructivos.

Métodos destructivos

El tratamiento de los extractos con ácido sulfúrico es el método destructivo más ampliamente utilizado para la eliminación de lípidos debido a su efectividad. Este método de limpieza se puede llevar a cabo bien por adición directa del ácido sobre el extracto,^{186,175,206,207,190,184} mezclando el extracto con sílice impregnada con el ácido¹⁷⁴ o haciéndolo pasar a través de columnas de gel de sílice impregnadas con el ácido.^{187,207,208, 189} La principal ventaja del modo en columna es que el extracto se hace pasar por la columna y se recoge a la salida exento de lípidos, mientras que el modo de adición directa requiere mayor manipulación de la muestra al tener que llevar a cabo etapas de LLE y centrifugación para obtener el extracto final. Además se obtienen mejores recuperaciones cuando se trabaja en columna. La única desventaja es que la sílice impregnada con sulfúrico debe manejarse con mucha precaución y debe evitarse la inhalación de sus pequeñas partículas ya que pueden provocar lesiones importantes en el sistema respiratorio. Los PBDEs no se degradan en condiciones ácidas fuertes, por lo que el tratamiento con ácido sulfúrico resulta muy adecuado para la eliminación de lípidos. Sin embargo, en ocasiones, es necesario determinar en la misma muestra otros

compuestos que no presentan su misma estabilidad, por lo que en esos casos será necesario recurrir a los métodos no destructivos.

Otra opción es la preparación de columnas de sílice impregnada con hidróxido de potasio o con una disolución alcohólica de hidróxido de sodio. Sin embargo, este tipo de columnas no presentan gran aplicabilidad por sí mismas ya que este tratamiento puede provocar la pérdida de átomos de bromo en los PBDEs con grados de bromación más altos. En cambio, el empleo de la sílice impregnada con sustancias básicas es mucho más frecuente en columnas de limpieza multicapa, que suelen combinar alúmina y distintas capas de sílice neutra y modificada con ácidos y bases para conseguir una mejor purificación de los extractos, proporcionando resultados satisfactorios en términos de recuperaciones y reproducibilidad.^{186,168,175,206,206, 184}

Métodos no destructivos

En aquellos casos en los que puede producirse la degradación de los analitos al someterlos a métodos destructivos para la limpieza de los extractos o cuando el contenido en lípidos es bajo, se puede recurrir a los métodos de eliminación de lípidos no destructivos.

El método no destructivo más ampliamente utilizado para la eliminación de los lípidos en extractos de muestras biológicas es la cromatografía de exclusión por tamaños o cromatografía por permeabilidad en gel (GPC),^{35,182,183,188} que permite la separación de las moléculas de analito y sus interferentes en función de su tamaño. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es un gel poroso, de forma que las moléculas pequeñas (PBDEs) van a difundir por los poros retrasando su salida de la columna cromatográfica, mientras que los interferentes (lípidos) al ser mucho más voluminosos no podrán difundir por los poros y saldrán antes. La fase estacionaria más comúnmente empleada es el copolímero poliestireno-divinilbenceno y suelen emplearse columnas para HPLC que ya vienen empaquetadas, proporcionan mejores eficacias en la separación, son más reproducibles y necesitan menor cantidad de disolventes que las columnas empaquetadas manualmente. Como eluyentes se suelen utilizar diclorometano y mezclas de diclorometano/hexano o etilacetato/ciclohexano. El principal problema que presenta este método de limpieza de los extractos es que en matrices con alto contenido en lípidos no es posible eliminarlos completamente, por lo

que suele ser necesario recurrir a etapas de limpieza adicionales mediante GPC o columnas de adsorción rellenas con Florisil o gel de sílice.

Otra opción de limpieza de los extractos no destructiva es mediante el uso de adsorbentes neutros como gel de sílice,^{185,188,190} alúmina^{35,177,187,207} o Florisil.^{191,208,210,213} La alúmina y el Florisil presentan mayor capacidad para retener los lípidos que el gel de sílice, que frecuentemente es empleado en combinación con alguno de los otros dos para mejorar su efectividad.

Eliminación de azufre

En muestras abióticas (suelos, sedimentos, lodos residuales) el azufre elemental puede dar lugar a interferencias importantes en la determinación de los BFRs. Los principales métodos de limpieza que permiten la eliminación del azufre son el tratamiento de la muestra o de su extracto con cobre elemental, preferentemente en polvo, para formar sulfuro de cobre (CuS) que se puede separar con facilidad.¹⁶⁸ Otro modo de eliminar este interferente es utilizando columnas de GPC.³⁵

Fraccionamiento de la muestra

En ocasiones puede ser necesario separar los analitos de interés de otros compuestos organohalogenados presentes en los extractos de la muestra y que puedan interferir con ellos en las etapas de separación y detección. Debido a que los PBDEs presentan una mayor polaridad que otros contaminantes organohalogenados pueden ser separados utilizando adsorbentes clásicos como gel de sílice, alúmina o Florisil. Sin embargo la alúmina y el Florisil presentan menor selectividad para los PBDEs por lo que generalmente se suelen utilizar columnas rellenas con sílice.¹⁸² Para la elución de los PBDEs se suele emplear hexano, diclorometano o mezclas de dietiléter con hexano o diclorometano. El carbón activo en columna también se ha utilizado en ocasiones para separar los PBDEs de otros contaminantes halogenados.^{174,186,206}

Otros métodos de limpieza

Puesto que la etapa de limpieza de los extractos suele ser un proceso largo y que requiere mucha manipulación de la muestra, en los últimos años se han desarrollado nuevas alternativas que permitan llevar a cabo esta etapa de un modo más sencillo y rápido. La técnica DLLME (sección A.2.1.1) ha sido empleada como segunda etapa en la limpieza del extracto de muestras de pescado tras su congelación y separación de las

gotas de grasa¹⁷³ o en la limpieza de extractos de sedimentos tras una primera etapa de limpieza mediante una columna de sílice en la que se ha dispersado la muestra (DSPE).¹⁷²

A.2.1.2.4 Extracción y limpieza simultáneas

En un intento de reducir el tiempo de preparación de muestra y con el fin de evitar en la medida de lo posible la abundante manipulación de la muestra en la etapa de limpieza, se han desarrollado estrategias que permiten llevar a cabo las etapas de extracción y limpieza en un sólo paso.

La extracción selectiva con líquidos presurizados (SPLE) consiste en llevar a cabo la extracción de la muestra mediante PLE y limpiar el extracto simultáneamente. Para ello en la celda de extracción se ponen tanto la muestra como el adsorbente que se va a utilizar para la limpieza, obteniéndose así extractos limpios que pueden ser inyectados directamente en el sistema cromatográfico. Los adsorbentes que suelen emplearse en la celda son Florisil,^{179,180} alúmina^{176,178} y sílice modificada¹⁸¹ o no en muestras con alto contenido en lípidos. Para muestras abióticas también suele incorporarse cobre en polvo para la eliminación de los sulfuros.¹⁷⁸

La SPME (sección A.2.1.1) en su modo de trabajo de HS también ha sido utilizada en algunos casos como método de extracción, limpieza y preconcentración simultáneas en la determinación de PBDEs. En general se ha aplicado al análisis de muestras abióticas (suelos, sedimentos y lodos residuales) cuyo contenido en lípidos es bajo.^{103,170,171}

A.2.2 Métodos de separación y detección

A.2.2.1 Métodos de separación y detección de THMs

Como ya se ha comentado anteriormente, los THMs presentan una alta volatilidad, por lo que se suele recurrir a la GC para su separación. Las columnas más comúnmente empleadas son columnas capilares de sílice fundida recubiertas con una fase estacionaria, que suele ser una fase apolar (PDMS) combinada con grupos fenilo o cianopropilfenilo para conseguir distintos grados de polaridad. En la *Tabla 23* se pueden ver la composición de las columnas más utilizadas para la separación de THMs por GC.

Tabla 23. Composición y polaridad de las fases estacionarias más utilizadas para la separación de THMs por GC

Fase estacionaria*	Polaridad	Ref.
100% PDMS	No polar	124, 139
5% difenil 95% PDMS	No polar	119, 123, 127, 128, 138, 140, 147, 157
14% difenil 86% PDMS	Ligeramente polar	122
20% difenil 80% PDMS	Ligeramente polar	149
35% difenil 65% PDMS	Polaridad intermedia	120
6% cianopropilfenil 94% PDMS	Polaridad intermedia	121, 136

*Composición exacta o equivalente de la fase estacionaria

Los detectores más utilizados para la determinación de THMs en muestras acuosas son el ECD^{120-122,124,138,140,149,150,157} y el de MS, que será descrito con más detalle en la sección A.3.^{119,123,127-130,136,137,147} Sin embargo, en algunas ocasiones se ha recurrido a otros detectores como PDPID¹⁵⁶ o DELCD¹³⁹ ya que, a pesar de que presentan una menor sensibilidad que ECD y MS, son sencillos y fáciles de transportar, por lo que resultan muy adecuados para la determinación de THMs *in situ*. Los métodos basados en la detección mediante AED¹³⁴ no han encontrado una gran aplicación hasta el momento. En las tablas incluidas en la sección A.2.1.1 se pueden ver las características analíticas, en términos de precisión y límites de detección, que presentan distintos métodos analíticos para la determinación de THMs con detección mediante este tipo de detectores.

A.2.2.1.1 Detector de captura electrónica (ECD)

El detector de captura electrónica (ECD) presenta una gran especificidad para compuestos que contienen grupos halógenos, por lo que resulta muy adecuado para la determinación de THMs en muestras de agua. Se basa en la medida del descenso de la corriente producido entre dos electrodos al pasar entre ellos moléculas que pueden captar electrones. Las principales ventajas que ofrece este detector son su selectividad (es insensible a hidrocarburos, alcoholes y cetonas) y su gran sensibilidad (rango de los

pg) a moléculas con átomos o grupos electronegativos capaces de captar electrones con facilidad. Las limitaciones que presenta son la necesidad de tener las muestras perfectamente secas ya que la presencia de trazas de agua destruye al detector y que su rango de linealidad es pequeño debido a que satura fácilmente.

A.2.2.2 Métodos de separación y detección de PBDEs

La técnica de separación más ampliamente utilizada en la determinación de PBDEs en muestras biológicas y medioambientales es la GC, ya que gracias a su gran poder de resolución es capaz de separar mezclas complejas en las que puedan estar presentes gran cantidad de congéneres u otras sustancias que no hayan podido ser eliminadas en las etapas de limpieza y fraccionamiento. Para la separación de los PBDEs mediante GC se han utilizado columnas capilares con fases estacionarias apolares o de baja polaridad, siendo la fase estacionaria 5% difenil 95% PDMS o alguna de sus equivalentes la más empleada.^{35,158,159,161,164-167,169,171-177,179-184,186-196,198-200,202-207,209-213,215,218} En cuanto a sus dimensiones, lo más habitual es el empleo de columnas de longitud entre 30-60 m, con diámetros internos del orden de 0,25-0,32 mm y con recubrimientos de espesor en torno a 0,25 µm. Trabajando con este tipo de columnas es posible separar una gran cantidad de congéneres. Sin embargo antes de utilizar una columna es necesario comprobar que no se producen coeluciones de los analitos de interés o los patrones internos con otros congéneres o sustancias presentes en el extracto limpio de la muestra. En este sentido se ha realizado un estudio en el que se evalúan los tiempos de retención y las posibles coeluciones de una serie de 126 congéneres junto con otros BFRs que suelen estar presentes en muestras reales en siete columnas diferentes que están entre las más empleadas en la separación de PBDEs.³¹ Este estudio concluye que no es posible conseguir una separación completa de todos los congéneres con ninguna de las columnas estudiadas, seleccionadas de entre las más utilizadas en la determinación de PBDEs (DB1, DB5, HT5, DB17, DBXLB, HT8 y CPSil19). Fijándose en los congéneres más abundantes en muestras reales y las fases estacionarias más utilizadas (DB5 y HT5) se observa una coelución entre los congéneres BDE 28 y BDE 33. El congénere BDE 47 coeluye con el PCB 180 en la columna DB5, sin embargo la detección por MS permite una separación en masas de estos dos compuestos por lo que se podrían determinar sin ningún problema. Los congéneres pentabromados BDE 99 y BDE 100 no presentan ninguna coelución en la columna DB5, aunque si coeluyen con los congéneres BDE 116 y BDE 109 respectivamente cuando se emplea la columna HT5

que tiene fase estacionaria equivalente a la DB5. Los congéneres BDE 154 y BDE 153 coeluyen en la columna DB5 con otros BFRs que fácilmente pueden estar presentes en las muestras como PBB 153 y MeTBBPA (BDE 154) y TBBPA y HBCD (BDE 153), por lo que se debe prestar especial atención a las etapas de limpieza y fraccionamiento para evitar que estas sustancias lleguen al extracto final. El congénere BDE 183 coeluye con PBB 169 en la DB5, aunque esta coelución es de menor importancia ya que se trata de un PBB minoritario.

Otro aspecto al que se debe prestar especial atención en la separación de PBDEs mediante GC es la posible degradación térmica de los congéneres con grados de bromación más altos. Para evitar que estos compuestos se degraden en el inyector, su temperatura no debe sobrepasar los 250-300 °C. Para evitar los sitios activos que favorecen la degradación de los compuestos termolábiles es preferible utilizar *liners* abiertos y sin lana de vidrio que deben ser cambiados con frecuencia. El tiempo de permanencia de los analitos en el bloque de inyección puede ser minimizado aplicando un pulso de presión para transferir rápidamente los analitos a la columna. Otra opción es el empleo de inyectores de tipo PTV que gracias a la combinación de la etapa de inyección fría con la de vaporización programada permite evitar los problemas de degradación térmica y además evita el posible fraccionamiento de los analitos típico de los inyectores que trabajan a alta temperatura, aunque son más complicados que los anteriores y requieren una optimización de sus parámetros. Para evitar la degradación térmica en la columna se suele recurrir a columnas más cortas, con diámetros internos más pequeños y recubrimientos de columna más delgados.

Los problemas de degradación térmica encontrados en la separación de PBDEs pueden ser evitados también empleando LC en lugar de GC en la etapa de separación. La técnica de HPLC no es capaz de resolver mezclas tan complejas como las que se pueden separar por GC, aunque permite resolver los principales componentes de las mezclas comerciales c-penta, c-octa y c-decaBDE.²¹⁶ Para la separación de PBDEs mediante HPLC se han utilizado columnas de fase reversa de tipo C18 y como fases móviles mezclas constituidas principalmente por metanol y en menor medida otros disolventes como agua, acetona, tolueno o acetonitrilo.^{160,178,163,208,216}

Como detectores se ha utilizado mayoritariamente el de MS, que será descrito con mayor detalle en la sección A.3, aunque en algunos casos se han utilizado otros como el UV¹⁶⁰ tras la separación de los analitos mediante LC debido a su sencillez, o el

ECD^{191,201,204,205} (descrito en la sección A.2.2.1.1) tras la separación por GC debido a su gran sensibilidad en la determinación de compuestos halogenados. Las tablas recogidas en la sección A.2.1.1 muestran las características analíticas, en términos de precisión y límites de detección, que presentan distintos métodos analíticos para la determinación de PBDEs con detección mediante estos tres tipos de detectores.

A.2.2.2.1 Detector de captura electrónica (ECD)

El ECD a pesar de presentar características en general muy adecuadas para la determinación de compuestos halogenados, en el caso concreto de los PBDEs presenta ciertos inconvenientes. Por un lado se observa una respuesta desigual para los diferentes congéneres ya que la sensibilidad no sólo se ve afectada por el grado de bromación sino que también influye el patrón de sustitución en los anillos aromáticos. Además, la presencia de otros compuestos halogenados en la muestra van a influir en la determinación de los PBDEs debido a la escasa selectividad de este tipo de detector, por lo que antes del uso de este detector es necesario comprobar mediante un detector de MS que para la columna que se va a utilizar y en las condiciones de trabajo concretas que se van a emplear no tienen lugar coeluciones entre los analitos y otras sustancias halogenadas que puedan interferir en los resultados finales.

A.2.3 Métodos oficiales de análisis

Ante la necesidad de controlar los niveles de estas sustancias, consideradas como perjudiciales para los seres vivos y su entorno, en muestras procedentes de los distintos compartimentos medioambientales, distintos organismos oficiales han publicado varios métodos de referencia que garantizan la fiabilidad de los resultados analíticos. Los métodos oficiales más conocidos son los publicados por la EPA, aunque existen otros organismos como el Comité de Métodos Estándar (SMC), dependiente de Asociación Americana de Salud Pública (APHA), la Asociación Americana de Obras Sanitarias (AWWA) y la Federación del Medioambiente del Agua (WEF) o el Comité Europeo de Normalización (CEN), organismo encargado de la estandarización a nivel de la Unión Europea, que también han publicado sus métodos oficiales para el control de estos contaminantes.

A.2.3.1 Métodos oficiales para la determinación de THMs en aguas

En los Estados Unidos existe una ley que garantiza la calidad de las aguas de consumo para la protección de la salud pública denominada Ley de Agua de Consumo Segura (SDWA). Basándose en esta ley, la EPA fija los valores permitidos para ciertas sustancias presentes en el agua y diseña los métodos oficiales para la determinación de dichas sustancias. En concreto los métodos de la serie 500 han sido diseñados para la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos presentes en aguas de bebida municipales. Los métodos 501.1, 501.2 y 501.3 son específicos para el análisis de THMs, mientras que los métodos 502.2, 524.2 y 551.1 son aplicables al análisis de una serie de compuestos orgánicos volátiles entre los que se incluyen los THMs.

El método 501.1 es aplicable a aguas naturales que aun no han sido sometidas al proceso de desinfección, a aguas que están siendo tratadas y que se encuentran en cualquier etapa del proceso o a las que ya han sido desinfectadas y se consideran aptas para el consumo. Este método indica cómo llevar a cabo el análisis de THMs utilizando la técnica de PT para separar los analitos de la matriz de la muestra y preconcentrarlos previamente a la separación de los analitos mediante GC. Aunque el método 501.1 no especifica el detector que se debe utilizar tras la separación por GC, recomienda utilizar (EI)MS, siempre que sea posible, para la identificación de los analitos por comparación de su espectro de masas con uno de referencia.

El método 501.2 es aplicable al mismo tipo de aguas que el 501.1. En este caso la técnica de preparación de muestra es LLE y como en el caso anterior se recomienda llevar a cabo la detección mediante (EI)MS tras la separación de los analitos mediante GC.

El método 501.3 es aplicable al mismo tipo de aguas que los dos métodos anteriores y describe el procedimiento que se debe llevar a cabo para la identificación y medida de la concentración de los cuatro THMs regulados por la legislación. En este caso la técnica empleada para la extracción y preconcentración es la de PT seguida de la separación de los analitos mediante GC y detección mediante (EI)MS en modo de barrido para la identificación de los analitos y en modo SIM para la cuantificación de los mismos.

El método 502.2 es aplicable al mismo tipo de aguas que los métodos anteriores. Este método permite llevar a cabo la determinación de los THMs y otros compuestos orgánicos volátiles (VOCs), es decir, compuestos lo suficientemente volátiles y poco

solubles en agua como para que puedan ser extraídos eficientemente de muestras de agua mediante la técnica PT. Una vez que los VOCs han sido separados de la matriz de la muestra y/o preconcentrados, se lleva a cabo la separación de los analitos por GC y posteriormente se detectan a la salida de la columna cromatográfica mediante un detector de fotoionización (PID).

El método 524.2 permite la determinación de compuestos orgánicos volátiles presentes en aguas subterráneas y superficiales así como en aguas de bebida en cualquier etapa del proceso de desinfección. Este método es bastante semejante al anterior. Mediante purga y trampa (PT) se separan los compuestos volátiles de la matriz de la muestra y se preconcentran. Posteriormente se lleva a cabo su separación mediante GC-(EI)MS, de modo que se pueden identificar y cuantificar los analitos de interés.

El método 551.1 se aplica a aguas naturales que aun no han sido sometidas al proceso de desinfección, a aguas que están siendo sometidas a dicho tratamiento y que se encuentran en cualquier etapa del proceso o a las que ya han sido desinfectadas y se consideran aptas para el consumo. Este método se emplea para la determinación de subproductos de desinfección originados en el proceso de desinfección de las aguas, disolventes clorados y ciertos herbicidas y pesticidas halogenados que pueden estar presentes en las aguas de consumo. La separación y/o preconcentración de los analitos en este caso se lleva a cabo mediante LLE utilizando metil-*tert*-butiléter (MTBE) o pentano como disolventes de extracción. En este caso se recomienda el uso de un ECD para la detección de los analitos tras su separación por GC.

Además de estos métodos de la serie 500, la EPA tiene otro método, el 1624C, que indica cómo llevar a cabo la determinación de THMs en matrices acuosas, entre otras muestras medioambientales. Este método es aplicable a la determinación de compuestos orgánicos volátiles tóxicos, entre los que se incluyen los THMs, en aguas, suelos y lodos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. El método 1624 C propone la extracción y preconcentración de los compuestos volátiles de interés mediante un sistema de PT. Posteriormente los analitos son separados y detectados mediante GC-(EI)MS. La cuantificación se lleva a cabo mediante Dilución Isotópica (ID), utilizando como patrón interno un análogo al analito marcado isotópicamente en ^{13}C o ^2H , siempre que éste esté disponible comercialmente. En el caso de los THMs, los cuatro compuestos disponen de un análogo marcado isotópicamente en ^{13}C .

Además de la EPA, existen otros organismos oficiales que han publicado sus métodos de referencia para la determinación de THMs, basándose en distintas técnicas analíticas. Así, el SMC propone tres métodos, el 6232 B, C y D. El método 6232 B sirve para la determinación de los cuatro THMs en aguas de consumo humano antes, durante y después del proceso de desinfección. Este método consiste en la extracción y preconcentración mediante LLE utilizando como disolvente pentano o como alternativa hexano, metilciclohexano, metil-*tert*-butiléter (MTBE) o 2,2,4-trimetilpentano. A continuación se separan y se detectan los analitos mediante GC-ECD. Este método ha sido aceptado por la USEPA como método equivalente al método EPA 501.2 de 1979.

El método 6232 C se puede aplicar al mismo tipo de muestras que el 6232 B, pero permite determinar muchos otros compuestos además de los THMs. Se basa en la extracción y preconcentración de los analitos por PT seguida de la separación de los mismos por GC y detección MS. El método 6232 D es semejante al anterior pero no indica el tipo de detector.

Por último, el Comité Europeo de Normalización (CEN) elaboró en 1997 la Norma Internacional ISO 10301, de la que existe la correspondiente versión oficial en español (EN ISO 10301). Esta Norma describe dos métodos alternativos para su aplicación en la determinación de hidrocarburos halogenados altamente volátiles por GC. Estos dos métodos requieren la utilización de un estándar interno adecuado para el calibrado y el control de la recuperación del proceso.

El primero de los métodos sirve para la determinación de hidrocarburos halogenados altamente volátiles en aguas potables, aguas subterráneas, aguas de piscinas, la mayoría de los ríos y lagos y muchas aguas residuales y efluentes industriales. Consiste en la separación y preconcentración de los analitos mediante LLE, utilizando pentano como disolvente. Posteriormente el extracto se analiza por GC sin especificar el detector a utilizar.

El segundo método sirve para la determinación de hidrocarburos halogenados altamente volátiles en aguas potables, aguas superficiales y aguas subterráneas. Es un método en el que la separación y preconcentración se lleva a cabo por HS, la separación por GC y la detección de los analitos separados mediante ECD u otro detector que pueda resultar adecuado.

A.2.3.2 Métodos oficiales para la determinación de PBDEs en muestras medioambientales

Hasta el momento sólo existen dos métodos oficiales enfocados a la determinación de PBDEs en distintas muestras de origen biológico y medioambiental y ambos han sido publicados por la EPA.

El método 527 se incluye dentro de los métodos EPA de la serie 500 que han sido diseñados para la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos presentes en aguas de bebida municipales. En concreto este método es aplicable a la determinación de determinados pesticidas y retardantes de llama, entre los que se incluyen los congéneres BDE 47, BDE 99 y BDE 100, en muestras de agua de consumo. En este método los analitos se extraen de la matriz mediante discos de SPE y son eluidos con acetato de etilo y diclorometano. Tras secar el extracto con sulfato de sodio anhidro y preconcentrarlo en corriente de nitrógeno, se inyecta en un sistema de GC con detección por MS.

El método 1614 es aplicable a la determinación de PBDEs en aguas, suelos, sedimentos y muestras de origen biológico. Los métodos de extracción recomendados en matrices acuosas son SPE o LLE, mientras que para muestras sólidas se recomienda llevar a cabo la extracción mediante SE. Para la limpieza de los extractos se recomienda el uso de columnas cromatográficas rellenas con gel de sílice (sílice ácida, básica y silicato de potasio), alúmina (ácida y básica) y/o Florisil, combinados o individualmente según las necesidades o mediante columnas de GPC. La etapa de limpieza no es necesaria para aquellas muestras consideradas como limpias (aguas subterráneas, aguas potables o aguas que ya han sido tratadas en plantas de depuración). Tras la etapa de limpieza los extractos son preconcentrados e inyectados en un sistema de GC de alta resolución (HRGC) para su separación y posterior detección mediante un MS de alta resolución (HRMS).

A.3 DETECCIÓN DE CONTAMINANTES ORGANICOS HALOGENADOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Como se ha visto en secciones anteriores, la Espectrometría de Masas es hoy en día la técnica más empleada para la detección de distintos tipos de contaminantes orgánicos

halogenados.^{123,219-223} Los instrumentos que se han venido utilizando para la detección de THMs y PBDEs se diferencian fundamentalmente en el tipo de fuente de ionización y de analizador de masas.

A.3.1 Fuentes de ionización

Existen gran variedad de fuentes de ionización capaces de generar iones en fase gaseosa (atómicos, moleculares o fragmentos según la aplicación). Sin embargo en esta sección sólo se comentarán aquellas que han sido utilizadas con mayor frecuencia para la determinación de THMs y PBDEs.

A.3.1.1 Ionización electrónica (EI)

La fuente de EI es sin duda la más utilizada para la ionización de los analitos tras su separación por GC. El acoplamiento GC-MS se realiza de forma relativamente sencilla a través de una línea de transferencia calentada por la que se hace pasar el final de la columna capilar justo hasta la entrada de la fuente de ionización. La fuente de EI consiste en una cámara con dos filamentos de W que emiten electrones. Los analitos separados llegan a la fuente de ionización donde son bombardeados por un chorro de electrones de alta energía ionizándose y fragmentándose. El grado de fragmentación dependerá del tipo de analito, de la energía aplicada al haz de electrones y de la temperatura de la fuente. Para una energía, temperatura de la fuente y analito determinados, los patrones de fragmentación se mantienen constantes independientemente del instrumento utilizado de forma que es posible identificar cada compuesto por comparación con las bibliotecas de espectros, en las que se pueden consultar los patrones de fragmentación de multitud de sustancias. Además de permitir obtener información estructural, utilizando esta fuente también es posible llevar a cabo la cuantificación a través de la monitorización del ion molecular o cualquier otro fragmento que ofrezca una sensibilidad adecuada. Cabe destacar que esta fuente proporciona una gran selectividad ya que permite distinguir analitos que coeluyan siempre que sea posible seleccionar iones característicos diferentes para la cuantificación de cada uno de ellos.

Estas ventajas hacen que la fuente de EI haya sido ampliamente utilizada para la identificación y cuantificación de gran variedad de contaminantes orgánicos. Así, esta es la fuente de ionización seleccionada en la mayoría de los trabajos dedicados a la

determinación de THMs por MS,^{119,123,127-129} ya que es capaz de generar fragmentos iónicos que proporcionan una buena sensibilidad para la cuantificación de estas sustancias (Tabla 24) y además, por su selectividad, resulta muy adecuada cuando se trabaja con muestras muy contaminadas o que contengan gran cantidad de materia orgánica.

Tabla 24. Iones seleccionados para la detección y medida de THMs

Compuesto	Ion	m/z	Abundancias relativas teóricas (%)
CHCl ₃	CHCl ₂ ⁺	83, 85	100, 65
CHBrCl ₂	CHCl ₂ ⁺	83, 85	100, 65
CHBr ₂ Cl	CHBrCl ⁺	127, 129	77, 100
CHBr ₃	CHBr ₂ ⁺	171, 173	51, 100

También existen numerosos trabajos en los que la fuente seleccionada para la determinación de PBDEs por MS es la de EI.^{103,161,165,167,169-175,179-181,183-187,189,192-194,196-198,200,202,203,206,207,209-215,218} Para la cuantificación se suele seleccionar el ion molecular (M^+) o el fragmento generado por la pérdida de dos átomos de bromo ($M-2Br^+$). De este modo se consigue obtener una buena selectividad (excepto cuando se produce la coelución de congéneres correspondientes al mismo grupo homólogo) y una sensibilidad aceptable, aunque ésta disminuye a medida que aumenta el grado de bromación de los analitos.

A.3.1.2 Ionización química negativa (NCI) o ionización negativa por captura de electrones (ECNI)

La NCI es una técnica de ionización suave que se ha utilizado en diversas ocasiones como fuente de ionización para la detección de sustancias que contengan grupos electrofílicos capaces de captar con facilidad electrones libres, como ocurre con los halógenos. El diseño de esta fuente es bastante semejante al de la fuente de EI. La principal diferencia entre ambas es que la fuente de NCI consta de un tubo conectado a la línea de transferencia por el que entra un gas reactivo, generalmente metano, y de un sello de resorte que impide la fuga del gas reactivo y permite que llegue a la cámara de ionización mezclándose allí con la muestra y el gas portador. Además las polaridades del voltaje del analizador deben invertirse para seleccionar iones negativos. En cuanto

a su funcionamiento, esta fuente requiere la introducción de grandes cantidades de gas reactivo en la cámara de ionización, de modo que la mayoría de los electrones emitidos por el filamento chocan con las moléculas del gas reactivo en lugar de chocar contra las moléculas de la muestra. Los choques producidos con el gas reactivo moderan la energía de dichos electrones que pasan a comportarse como electrones térmicos, que ya no son capaces de formar iones positivos ni fragmentar la molécula sino que quedan libres y pueden ser aceptados fácilmente por moléculas que contengan grupos electrofílicos. La energía específica requerida para que tenga lugar la captura electrónica depende en gran medida de la estructura molecular del analito y los espectros obtenidos dependerán en gran medida de las condiciones experimentales de trabajo (tipo de gas reactivo, presión del gas reactivo, temperatura de la fuente de ionización e instrumento empleado).

La principal ventaja que aporta el empleo de esta técnica de ionización en la determinación de sustancias que contengan grupos electrofílicos fuertes es su gran sensibilidad, derivada de la eficiencia con la que los analitos captan electrones térmicos, formando un producto anión dominante en lugar de generar múltiples fragmentos. Por otro lado, esta fuente también destaca por su selectividad, ya que sólo ioniza sustancias con grupos electrofílicos capaces de captar electrones térmicos en unas condiciones experimentales concretas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la presencia de otras sustancias en la muestra que contengan el mismo grupo funcional pueden interferir en la etapa de detección ya que se comportarán como electróforos de forma similar a la de los analitos de interés. Este problema de selectividad puede solucionarse recurriendo a técnicas adecuadas de limpieza, fraccionamiento y separación cromatográfica de los extractos de las muestras, que eviten coeluciones entre los analitos de interés y otras sustancias que puedan interferir en su determinación. En estos casos es necesario recurrir a la fuente de EI para asegurar que no se produce ninguna coelución de los analitos entre sí o con otros interferentes. La principal desventaja de esta fuente con respecto a la de EI es que requiere un mantenimiento bastante frecuente.

La buena sensibilidad aportada por esta técnica ha sido aprovechada para la determinación de PBDEs en muestras que contienen bajos niveles de concentración de estas sustancias,^{158,159,164,168,176,177,182,185,188,190,197,199} especialmente para los congéneres con grados de bromación más altos, que muestran problemas de sensibilidad cuando se

recurre a otras técnicas de ionización como EI. Al ser ionizados en la fuente de NCI los PBDEs suelen dar lugar a espectros de masas en los que predomina el ion Br^- con la típica distribución isotópica del Br (^{79}Br 50,5% y ^{81}Br 49,5%) por lo que estos iones son, en general, los seleccionados para llevar a cabo la cuantificación. Desafortunadamente, puesto que esta fuente apenas genera fragmentos distintos a éstos, no es posible su uso para la identificación de sustancias.

A.3.1.3 Plasma de acoplamiento inductivo (ICP)

La fuente de ICP consta de una antorcha de cuarzo con tres canales concéntricos rodeada por una bobina refrigerada con agua y conectada a un generador de radiofrecuencia. A través de los tres canales de la antorcha se hace pasar una corriente de argón. Para iniciar el plasma, se introducen electrones mediante una chispa generada con un tesla. Los electrones son entonces acelerados en el campo magnético inducido por la aplicación de las radiofrecuencias en la bobina que rodea la antorcha, colisionando con los átomos neutros de argón e ionizándolos. Los iones y los electrones así formados continúan colisionando entre sí, manteniendo de este modo el plasma mientras se mantenga el campo de radiofrecuencias. Los analitos, que llegan separados al espectrómetro de masas, son arrastrados por una corriente de argón e introducidos por el canal central de la antorcha en forma gaseosa (GC) o de fino aerosol tras pasar por la cámara de nebulización (LC) de forma que cuando llegan al plasma son desolvatados, vaporizados, atomizados e ionizados. Debido a que el ICP atomiza e ioniza todas las moléculas que llegan al plasma, el empleo de esta fuente únicamente permitirá obtener información elemental, perdiéndose en todo caso la información acerca de la estructura de los analitos. En contraposición, esta propiedad del ICP ofrece la ventaja teórica de que la respuesta del detector, y por tanto la señal analítica, dependerá exclusivamente de la cantidad de iones del elemento o heteroátomo de interés presentes en el plasma y no de la estructura molecular de la especie que los haya generado, de modo que en la calibración se pueden utilizar como patrones sustancias diferentes al analito que compartan con él un elemento ionizable en ICP.²²⁴⁻²²⁷ Esta característica resulta muy útil para la cuantificación de sustancias cuya composición no se conoce con exactitud o para las que no existen patrones disponibles comercialmente.

El grado de ionización que alcanzan los analitos depende de la densidad electrónica del plasma, la temperatura y sus diferentes potenciales de ionización. La mayoría de los elementos de la tabla periódica tienen un primer potencial de ionización menor de 9 eV y su grado de ionización en el plasma superará el 80%, por lo que esta fuente se caracteriza en general por su elevada sensibilidad. Sin embargo los elementos halógenos, poseen potenciales de ionización elevados (*Tabla 25*), por lo que se ionizarán con dificultad en el plasma. Al generarse una menor cantidad de iones los límites de detección serán más elevados de lo que cabría esperar utilizando una técnica *a priori* tan sensible.

Tabla 25. Potenciales de ionización y grados de ionización de algunos elementos en un plasma ICP

Elemento	Primer potencial de ionización (eV)	Grado de ionización* (%)
Na	5,14	100
F	17,423	9×10^{-4}
Cl	12,968	0,9
Br	11,814	5
I	10,451	29
Ar	15,795	0,04
He	24,587	-

*Grado de ionización calculado por la ecuación de Saha con temperatura de ionización (T_{ion}) de 7500 K²²⁸

Con el fin de mejorar los límites de detección para los halógenos se han propuesto algunas alternativas. Una opción sería utilizar helio como gas plasmógeno en lugar de argón.^{229,230} El helio tiene el primer potencial de ionización mucho más alto que el argón (*Tabla 25*), proporcionando mejores grados de ionización para los halógenos y algunos no metales. Por ello los plasmas de helio y los de mezcla de argón y helio se consideran fuentes de ionización más eficaces para estos elementos. Además el empleo de helio como gas plasmógeno ofrece como ventaja adicional, una menor formación de interferencias poliatómicas.²³¹ Desafortunadamente, el acoplamiento de estos plasmas al espectrómetro de masas (MS) requiere modificaciones instrumentales importantes.²²⁹

A pesar de esta limitación, el ICP se ha utilizado en algunos casos como fuente de ionización para el análisis de compuestos halogenados,^{232,225,233,234,195,35,216} demostrándose en algunos casos que a pesar de los bajos grados de ionización, es posible conseguir límites de detección mejores que los obtenidos con otras fuentes típicamente empleadas para la determinación de compuestos halógenos por su sensibilidad.³⁵

A.3.1.4 Fotoionización a presión atmosférica (APPI)

La APPI es una técnica de ionización muy suave que permite la ionización de compuestos hidrofóbicos tras su separación por LC. En esta técnica, la energía suministrada por una fuente UV es utilizada para ionizar las moléculas de un agente dopante (sustancia con una energía de ionización inferior a la suministrada por los fotones). Los cationes radicales generados pueden entonces ionizar a los analitos mediante procesos de transferencia de carga. Para la formación de iones negativos la ionización puede ocurrir por desprotonación, captura de electrones o transferencia de carga. La formación de un catión radical hace posible la ionización de moléculas apolares que no pueden ser eficientemente ionizadas mediante otras técnicas como la ionización química a presión atmosférica (APCI) o por electrospray (ESI), típicamente empleadas para la ionización de sustancias tras su separación por LC. El uso de esta fuente en el modo de trabajo de ionización negativa ha mostrado resultados prometedores en el análisis de PBDEs, especialmente para aquellos congéneres que requieran llevar a cabo su separación mediante LC debido a su susceptibilidad a la degradación térmica.^{163,208,178} Casi todos los congéneres dan lugar a iones con pérdida de un átomo de bromo en el ion molecular y de la ganancia de un átomo de oxígeno procedente del entorno a presión atmosférica (M-Br+O). Puesto que con esta fuente de ionización los analitos conservan su estructura molecular será posible llevar a cabo tanto la identificación de sustancias como su cuantificación.

A.3.2 Analizadores de masas

Existen distintos tipos de analizadores de masas, que pueden trabajar en combinación con diferentes fuentes de ionización. En esta sección sólo se describirán aquellos que se hayan aplicado a la determinación de compuestos orgánicos halogenados.

A.3.2.1 Analizador de masas tipo cuadrupolo (Q)

El analizador de tipo cuadrupolo se comporta como un filtro de masas y está formado por cuatro barras hiperbólicas situadas en torno a un eje central. Estas barras están conectadas dos a dos, un par al polo negativo y otro al positivo de una fuente de corriente continua y además se aplica a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia desfasados 180°. Los iones al pasar entre estas barras describen trayectorias oscilantes de forma que, para cada pareja de valores de corriente continua y radiofrecuencias definido, sólo los iones con una determinada relación m/z tendrán una trayectoria estable y pasarán entre las barras hacia el detector. Variando los potenciales aplicados al cuadrupolo es posible variar los valores m/z transmitidos, haciendo posible el barrido espectral. Para asegurar que los iones generados no se pierdan al chocar con moléculas de gases del aire y que los resultados sean reproducibles, es decir, que no se produzcan cambios en el patrón de fragmentación de los compuestos, es necesario someter el sistema a alto vacío. Para ello se utiliza una bomba de vacío y una bomba turbomolecular que permiten obtener vacíos del orden de 10^{-5} Torr en la fuente y el analizador.

Este tipo de analizador es uno de los más utilizados hoy en día y destaca por su sencillez y facilidad de uso. El cuadrupolo se puede considerar un analizador robusto y relativamente barato, y gracias a su alta velocidad de barrido resulta muy adecuado para la monitorización a tiempo real de sustancias que han sido separadas mediante métodos cromatográficos. Todas estas ventajas, junto con la relativa sencillez del acoplamiento hacen que sea muy adecuado como detector en GC.

El analizador de tipo cuadrupolo ha sido el seleccionado para la detección de THMs por espectrometría de masas (MS) con fuente de ionización por impacto electrónico (EI) y tras su separación por GC.^{119,123,127-129} En las tablas incluidas en la sección A.2.1.1 se pueden ver las características analíticas, en términos de precisión y límites de detección, que presentan distintos métodos analíticos para la determinación de THMs con detección mediante (EI)MS. El sistema GC-(EI)MS puede trabajar en el modo de barrido o “*scan*”, permitiendo la identificación de otras especies que hayan podido ser extraídas de la matriz de la muestra junto con los analitos a través de su espectro de masas por comparación con las bibliotecas de espectros de las que dispone. Además proporciona una sensibilidad aceptable (en el rango de los pg o incluso sub-pg) y selectividad cuando se trabaja en el modo SIM (*selected ion monitoring*).

El analizador de tipo cuadrupolo también se ha empleado en muchos trabajos para la determinación de PBDEs tras su separación cromatográfica en combinación con distintos tipos de fuente de ionización como la EI,^{165,167,169,170,173,181,189,194,196,197,200,202,203,209,212,213,214} NCI^{158,159,164,168,176,177,182,188,190,197,199} o ICP.^{35,195} Las tablas de la sección A.2.1.2.2 recogen las características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que emplean un analizador de masas de tipo cuadrupolo en la etapa de detección de PBDEs por MS.

Las principales desventajas que presenta el cuadrupolo con respecto a los analizadores de masas de alta resolución (HRMS) son una menor resolución, exactitud en masas y sensibilidad.

A.3.2.2 Trampa iónica de cuadrupolo (QIT)

El funcionamiento de la trampa de iones se basa en el mismo principio que el analizador de masas de tipo cuadrupolo. La trampa de iones es un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos generados en la fuente de ionización pueden ser confinados durante ciertos períodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos. La trampa consta de un electrodo anular y un par de electrodos colectores hiperbólicos. Al electrodo anular se le aplica un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados con tierra, de modo que los iones con un valor apropiado de m/z circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que está rodeada por el anillo. La trampa se rellena con helio que, mediante colisiones repetidas con los iones generados ayudará a enfriar y atrapar los iones forzándolos a situarse en el centro de la trampa donde el campo cuadrupolar está mejor definido. La presencia de helio en la trampa proporciona mejoras significativas tanto en la sensibilidad como en la resolución de masas de la trampa iónica y además permite la fragmentación posterior de iones de interés que hayan sido seleccionados en la trampa para llevar a cabo su análisis estructural. En la trampa se pueden retener todos los iones generados en la fuente de ionización. Variando el rango de radiofrecuencias aplicado sobre los electrodos se pueden ir expulsando de la trampa los iones con una determinada relación m/z permitiendo así realizar barridos de masas. En la trampa también se puede seleccionar una relación m/z concreta que posteriormente puede ser fragmentada para obtener información adicional sobre la estructura de los analitos (MS^n).

El analizador de trampa iónica de cuadrupolo es robusto, económico en comparación con los analizadores de alta resolución y sencillo de manejar. Además presenta una alta velocidad de barrido lo que junto a la sencillez del acoplamiento a técnicas cromatográficas de separación lo convierte en un analizador muy adecuado para la monitorización de analitos que han sido separados tanto por GC como por LC con diferentes fuentes de ionización. La sensibilidad proporcionada por este analizador es del orden de la que ofrece el analizador de tipo cuadrupolo (Q). Las principales limitaciones de este analizador son su resolución, que como en el caso del analizador de tipo cuadrupolo está en el orden de la unidad y su limitado rango lineal.

Este analizador se ha utilizado en algunos casos para la determinación de PBDEs en combinación con la fuente de ionización EI principalmente,^{103,161,171,172,175,179,180,183,186,187,192,198,210,211,218,} aunque en algunos casos también se han utilizado otras como la APPI,¹⁶³ tras la separación de los analitos mediante GC o LC. En las tablas de la sección A.2.1.2.2 se pueden consultar las características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que emplean un analizador de masas de trampa iónica en la etapa de detección de PBDEs por MS.

A.3.2.3 Analizador de triple cuadrupolo (QqQ)

La MS en tándem (MS/MS) con analizadores de triple cuadrupolo (QqQ) ofrece una gran selectividad y mejor sensibilidad que los analizadores de masas descritos anteriormente por lo que pueden resultar muy adecuados para la detección de analitos de interés en muestras complejas. Este tipo de analizador consta de dos cuadrupolos (Q) acoplados mediante uno intermedio que hace de celda de colisión (q). En el primer cuadrupolo (Q1) se selecciona la relación m/z de interés, que se suele denominar ión precursor, éste pasa a través de la celda de colisión (q) dónde se fragmenta, los iones producto son separados por el segundo cuadrupolo (Q2). La fragmentación se produce por la colisión del ión seleccionado con moléculas de un gas inerte y recibe el nombre de disociación inducida por colisión (CID).

El sistema de analizador de triple cuadrupolo se ha utilizado en algunas ocasiones en la determinación de PBDEs presentes a muy bajos niveles de concentración en distintos tipos de muestras de origen biológico y medioambiental como alternativa a los analizadores de masas de alta resolución. Generalmente este tipo de analizadores se utilizan tras separar los analitos mediante LC, cuya resolución es inferior a la obtenida

en GC aunque también se ha utilizado en GC. Las fuentes de ionización utilizadas son las de EI^{184,185} o NCI¹⁸⁵ cuando la separación se lleva a cabo mediante GC y APPI^{178,208} cuando los analitos se separan por LC. Las características analíticas obtenidas mediante distintos métodos que emplean un analizador de masas de tipo triple cuadrupolo en la etapa de detección de PBDEs determinados por MS pueden verse en las tablas que aparecen en la sección A.2.1.2.2.

A.3.2.4 Analizador de masas de alta resolución (HRMS)

Los analizadores de masas de alta resolución (HRMS) se basan en el uso combinado de un sector magnético y un sector electrostático para la separación de los iones generados en la fuente de ionización. Los iones, pasan a través del sector electrostático que actúa sobre el haz de iones a modo de filtro energético independiente de la masa del ión o de su relación m/z , de forma que se consigue colimar los haces iónicos que emergen de la fuente en haces monoenergéticos uniformes. Una vez conseguido esto, estos haces iónicos son dirigidos a la entrada de un campo magnético sectorial donde se aplica un campo magnético perpendicular a la dirección del movimiento de los iones, forzándolos a adquirir una trayectoria circular dependiente del campo magnético aplicado (geometría de Nier-Johnson). De este modo sólo los iones capaces de pasar a través de una estrecha ventana de masas, definida por la intensidad de corriente aplicada para generar el campo magnético, son capaces de llegar al detector. Dependiendo del instrumento de trabajo, este analizador también puede mostrar una configuración inversa en la que primero se coloca el sector magnético para la separación de los iones en función de su relación m/z seguido de un sector electrostático para reducir la dispersión de energías de los iones seleccionados en el sector magnético (geometría de Nier-Johnson inversa). Para conseguir un espectro de masas completo se debe ir variando la intensidad aplicada al electroimán para que los iones con distinta relación m/z vayan llegando secuencialmente al detector. También es posible trabajar en modo SIM para obtener mejores sensibilidades.

La ventaja fundamental de este tipo de analizadores frente a los que emplean cuadrupolos es su gran selectividad derivada de la posibilidad de trabajar en el modo de alta resolución cuando se estrecha la ventana que define el rango de masas capaces de llegar al detector. Este analizador de masas destaca también por su exactitud en masas, que lo hace muy adecuado en medidas de relaciones isotópicas y que permite

obtener gran exactitud en la cuantificación, así como por su buena reproducibilidad y su gran rango dinámico. Por otro lado, trabajando en baja resolución es posible mejorar la sensibilidad considerablemente, por lo que este analizador resulta muy adecuado para la determinación de sustancias a muy bajos niveles de concentración. Como desventajas cabe destacar que su coste es muy superior al de otros analizadores de masas y además se requiere personal cualificado para su manejo.

Este analizador ha sido empleado en algunos casos en la determinación de PBDEs tras su separación mediante GC y fuente de ionización de EI.^{174,180,193,206,207} Las características analíticas obtenidas con distintos métodos que emplean analizadores de tipo HRMS en la determinación de PBDEs se pueden ver en la sección A.2.1.2.2.

A.3.3 Métodos de determinación y confirmación

Como se ha visto en las secciones anteriores la Espectrometría de Masas es una técnica de análisis muy potente que se ha utilizado ampliamente en la determinación de contaminantes orgánicos halogenados. Según el tipo de instrumentación empleada, esta técnica permite identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, elucidar la estructura y propiedades químicas de moléculas o determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. A continuación se describirán las principales aportaciones de la MS a la determinación de compuestos orgánicos halogenados.

A.3.3.1 Identificación y confirmación

Una de las principales ventajas que aporta el empleo de la MS en la determinación de compuestos orgánicos es su capacidad para la identificación de sustancias presentes en una muestra. Para que pueda llevarse a cabo la identificación y confirmación de sustancias el espectrómetro de masas debe tener una fuente de ionización que sea capaz de generar iones que conserven buena parte de la estructura de la molécula.

La fuente de EI es la más utilizada en la identificación y confirmación de contaminantes orgánicos halogenados por su fiabilidad y versatilidad. Cuando una molécula llega a esta fuente de ionización se fragmenta formando distintos iones positivos que conservan en mayor o menor medida la estructura de la molécula. Para unas condiciones determinadas de trabajo (energía y temperatura de la fuente) el perfil de fragmentación de cada molécula es constante e independiente del instrumento

utilizado, por lo que haciendo un barrido de todo el espectro de masas se obtiene una “huella dactilar” característica que permite la identificación inequívoca de cada molécula. La identificación de sustancias se suele llevar a cabo por comparación de los espectros de masas de los analitos con los recogidos en las bibliotecas de espectros, que son bases de datos en las que se incluyen los espectros de masas de gran cantidad de sustancias en las condiciones de trabajo más frecuentes (70 eV).

La presencia de halógenos (Cl y Br) en una molécula se puede detectar fácilmente a la vista de su espectro de masas ya que tanto el ión molecular como los fragmentos que los contengan suelen conservar el perfil isotópico de los elementos halógenos o sus combinaciones. En la *Figura 10* se pueden ver los perfiles característicos que se observan en iones y fragmentos moleculares que contienen uno o varios átomos de Cl y/o Br.

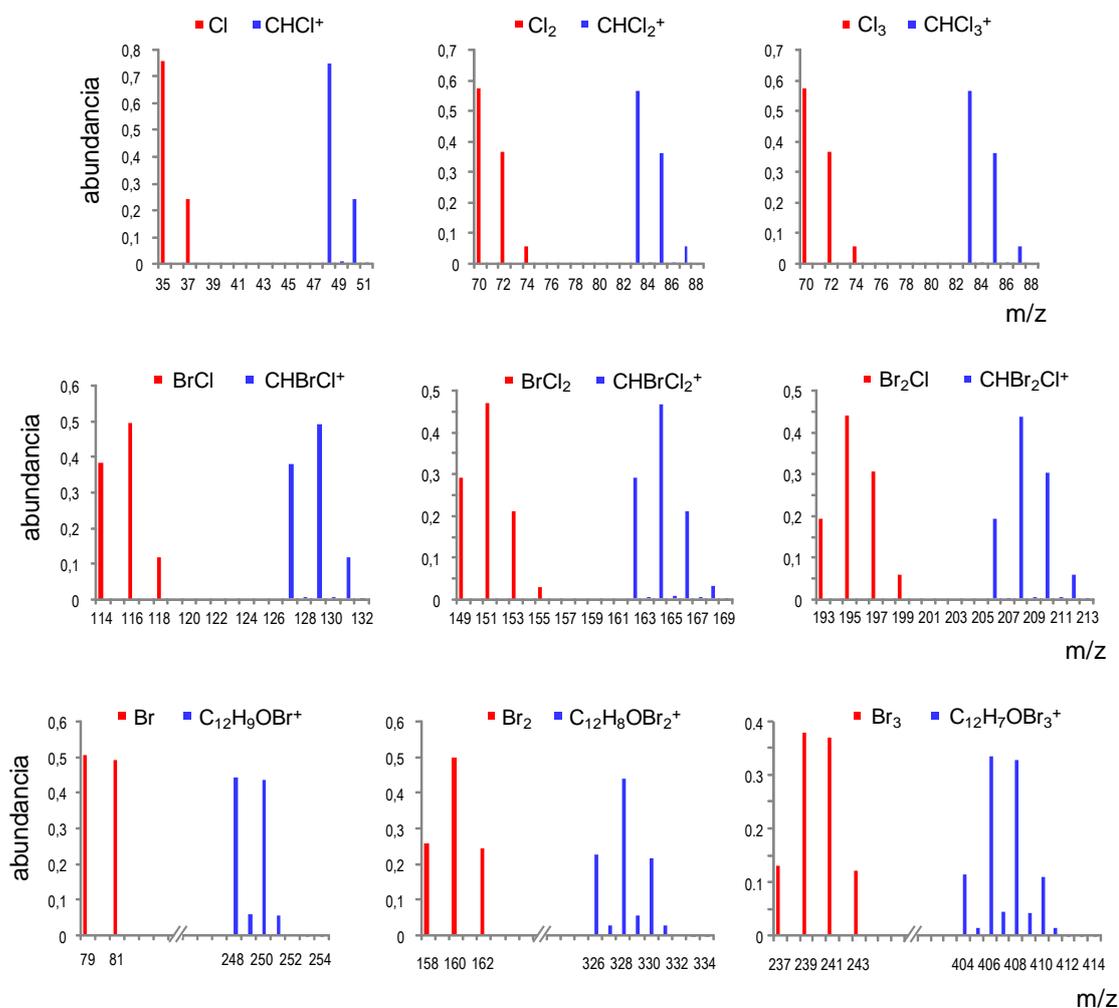


Figura 10. Perfiles isotópicos característicos de iones y fragmentos halogenados

Por otro lado la legislación exige la confirmación de la presencia de las sustancias consideradas como contaminantes para poder asegurar que éstas están presentes en una determinada muestra. Los métodos oficiales son los que recomiendan los criterios a seguir para la confirmación de sustancias.

Para la confirmación de la presencia de THMs en una muestra los métodos oficiales de la EPA recomiendan la comparación de los tiempos de retención del analito y su patrón correspondiente tras llevar a cabo la separación cromatográfica con dos columnas diferentes y con diferentes programas de temperatura. Si los tiempos de retención obtenidos para el analito y el patrón coinciden en ambas columnas se puede confirmar la presencia del analito en la muestra. Además, la mayoría de los métodos de la EPA recomiendan recurrir a la técnica de GC-(EI)MS siempre que sea posible para la identificación cualitativa inequívoca de los analitos. En este caso la confirmación se puede llevar a cabo por comparación de los espectros de masas obtenidos para el analito con los obtenidos para su patrón correspondiente. Cuando se requiere mayor sensibilidad en la determinación será necesario trabajar en modo SIM, por lo que en este caso se confirma la presencia de THMs por comparación de las abundancias isotópicas relativas de los isótopos naturales de Cl y Br con los de los iones característicos seleccionados para la determinación de los analitos. Por su parte la Norma Europea ISO 10301 recomienda llevar a cabo la confirmación de la presencia de THMs en una muestra por comparación de tiempos de retención entre el analito y su patrón correspondiente utilizando dos columnas de diferente polaridad e indica que la fiabilidad del proceso aumenta al incrementarse la diferencia de polaridad entre las columnas utilizadas. Esta Norma también recomienda recurrir a la técnica de MS como método suplementario de confirmación.

En el caso de los PBDEs los métodos oficiales publicados por la EPA proponen la confirmación por comparación de los tiempos de retención relativos de los analitos y sus patrones en dos columnas diferentes. Otra opción es la comparación de tiempos de retención relativos con los valores previamente tabulados para la separación de PBDEs con una columna concreta y en unas condiciones de trabajo determinadas. El método 1614 métodos también propone la identificación a través de las masas exactas de cada congénere así como por comparación de los espectros de masas o las relaciones de abundancias entre dos de sus iones característicos con los obtenidos para los patrones.

A.3.3.2 Cuantificación

La cuantificación de contaminantes orgánicos halogenados mediante MS suele llevarse a cabo a través de curvas de calibrado que se obtienen midiendo la señal analítica que generan los patrones de cada analito a distintos niveles de concentración. Para construir la curva de calibrado se debe monitorizar la señal generada por el ión más adecuado en cada caso, que dependerá de la fuente de ionización empleada. El ion o iones seleccionados para la cuantificación deben ser aquellos que proporcionen señales más altas, ya que éstos serán los que proporcionen una mayor sensibilidad al método de cuantificación e, idealmente, deben estar libres de interferencias, es decir, ser específicos del analito, de forma que sea posible la separación en masas de aquellos interferentes que no hayan podido ser separados en las etapas de limpieza y fraccionamiento de la muestra o en la de separación. En caso de que el extracto final de la muestra contenga sustancias interferentes u otros analitos con el mismo ion característico será posible utilizar fuentes que no generen iones específicos siempre que se haya confirmado previamente que ninguno de ellos coeluye con el analito a determinar.

Por otra parte, para mejorar la exactitud de los resultados obtenidos se suele recurrir al empleo de patrones internos que permitan corregir las recuperaciones de todo el proceso analítico así como las pequeñas variaciones en el volumen de muestra inyectado. El patrón interno ideal es aquel que tiene un comportamiento muy semejante al del analito de interés pero que no está presente en la muestra, por ello los patrones marcados isotópicamente análogos a los analitos, que presentan la misma estructura y propiedades fisicoquímicas que sus análogos no marcados, son considerados como patrones internos ideales y su uso ha dado lugar al método de cuantificación denominado dilución isotópica (ID) caracterizado por ofrecer mejor exactitud y precisión en los resultados obtenidos. Para poder llevar a cabo la cuantificación por ID hay que tener en cuenta que solamente podrá llevarse a cabo cuando se trabaje con fuentes de ionización en la que los iones o fragmentos medibles conserven la marca, ya que en caso contrario no será posible diferenciar la señal generada por el analito de la generada por el patrón marcado, que puesto que coeluyen y se fragmentan de igual manera sólo podrán ser separados en función de su masa característica. Teniendo en cuenta que la mayoría de los patrones marcados isotópicamente disponibles comercialmente llevan como marca ^{13}C o ^2H , la fuente de EI

ha sido la más utilizada para la determinación de distintos analitos mediante ID, aunque en los últimos años la síntesis de patrones marcados en heteroátomos ha hecho posible el empleo de otras fuentes de ionización como el ICP en la determinación de contaminantes orgánicos prioritarios en muestras de interés medioambiental.²³⁵⁻²³⁹

Los métodos de la EPA que proponen la determinación de los THMs con detección por MS (501.3 y 524.2) proponen utilizar fluorobenceno como patrón interno y realizar calibrados acuosos en los que los patrones utilizados para el calibrado son extraídos de la matriz de la muestra en las mismas condiciones en las que se extraen los analitos. Otros métodos que aunque no especifican el detector a utilizar sí que recomiendan la detección por MS (501.1 y 501.2) no especifican ni recomiendan el uso de ninguna sustancia como patrón interno. La Norma ISO 10301 propone llevar a cabo tanto calibrados externos como calibrados totales del proceso para el estudio de las recuperaciones y además permite hacer un recalibrado de rutina realizado con un mínimo de dos puntos para la cuantificación diaria. Los patrones internos que sugiere la Norma Europea son 1-bromo-2-dicloroetano, 1,2-dibromoetano, trans-1,2-dicloroetileno, bromotriclorometano o 1,2-dibromo-1,1-dicloroetano. Al revisar la bibliografía de los últimos años se puede ver que el patrón interno más utilizado en la determinación de THMs por MS es el fluorobenceno,^{127,128,133,137,146} aunque en algunas ocasiones se han empleado otros como 2-bromo-2-cloro-1,1,1-trifluoroetano¹¹⁹ o 4-bromofluorobenceno^{133,146} o simplemente no se ha utilizado patrón interno.^{123,129,136}

Por otro lado, el método de la EPA 1624C recomienda llevar a cabo la cuantificación de compuestos orgánicos volátiles mediante ID siempre que estén disponibles comercialmente sus análogos marcados con ^{13}C o ^2H . En el caso de los THMs existen patrones marcados en ^{13}C y ^2H para todos ellos, sin embargo son pocos los trabajos que se encuentran en la bibliografía que hayan recurrido a esta técnica de cuantificación.¹⁵⁵

En el caso de los PBDEs el método 527 que está diseñado para la determinación de pesticidas y retardantes de llama en agua potable recomienda el uso de algunos PAHs deuterados como patrones internos para la cuantificación de estas sustancia mediante curvas de calibrado. Por su parte el método 1614 de la EPA propone el uso de patrones de PBDEs marcados isotópicamente en ^{13}C para los congéneres considerados como prioritarios así como para todos aquellos que dispongan de un patrón marcado análogo al analito. En aquellos casos en los que el análogo marcado no esté disponible comercialmente este método propone llevar a cabo la cuantificación mediante curvas

de calibrado seleccionando de entre los patrones marcados disponibles el que resulte más adecuado como patrón interno para cada congénere. La fuente de ionización más adecuada para la cuantificación de los PBDEs por ID es la de EI ya que, como se ha mencionado anteriormente, en el espectro de masas obtenido con la fuente de NCI predominan los iones de Br, que no conservan la marca isotópica, mientras que la señal obtenida para otros fragmentos que sí la conservan es mucho menor.²⁴⁰ No obstante, el congénere BDE-209 muestra un perfil de fragmentación significativamente diferente al que presentan los congéneres con grados de bromación más bajos, con tres fragmentos de mayor intensidad, lo que hace posible la cuantificación de este compuesto mediante ID utilizando la fuente de NCI.²⁴¹ Para el resto de los congéneres esto solamente es posible mediante una optimización de las condiciones de trabajo de la fuente de modo que se favorezca la formación del ion molecular y/o de fragmentos con pesos moleculares más elevados.²⁴²

En la bibliografía se pueden encontrar numerosos trabajos en los que se lleva a cabo la determinación de PBDEs en muestras biológicas y medioambientales mediante ID, utilizando analizadores de masas tanto de alta^{174,180,193,206,207} como de baja resolución,^{169,175,179,180,186,187} y todos ellos en combinación con la fuente EI. En otros casos se ha recurrido al empleo de otras sustancias como patrón interno. Generalmente se utilizan otros POPs con estructura y características similares a los PBDEs, como por ejemplo el PCB 209^{161,172,176,177,183,192,194,196,199,200,212} o algún PBB.^{174,195} En otros casos se utilizan algunos PBDEs poco frecuentes comprobando previamente que no están presentes en las muestras de interés.^{158,159,164,182,190} En ciertas ocasiones, como indica el método 1614 de la EPA se han utilizado patrones marcados isotópicamente como patrones internos de otros congéneres,^{103,165,167,181,184,185,188,189,197,198,203,209,210,211} ya que aunque su estructura no sea exactamente igual sus propiedades fisicoquímicas y su comportamiento será bastante parecido siempre que el grado de bromación entre el analito y el patrón interno no sean muy diferentes.

A.4 BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Council Directive 1999/13/EC of 11 March 1999 on the limitation of emissions of volatile organic compounds due to the use of organic solvents in certain activities and installations. *Official Journal of the European Communities*, 29.3.1999, L85, 1-22.
- ² A.D. Nikolaou, S.K. Golfinopoulos, M.N. Kostopoulou, G.A. Kolokythas, T.D. Lekkas. **Determination of volatile organic compounds in surface waters and treated wastewater in Greece.** *Water Res.*, 2002, 36, 2883-2890.
- ³ D.F. Juang, C.H. Lee, S.C. Hsueh. **Chlorinated volatile organic compounds found near the water surface of heavily polluted rivers.** *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 2009, 6(4), 545-556.
- ⁴ C.Y. Yang, Z. P. Xiao, S. C. Ho, T. N. Wu, S. S. Tsai. **Association between trihalomethanes concentrations in drinking water and adverse pregnancy outcome in Taiwan.** *Environ. Res.*, 2007, 104, 390-395.
- ⁵ J.J. Rook. **Haloforms in drinking water.** *J. Am. Water Works Assoc.*, 1976, 68(3), 168-172.
- ⁶ A.T. Bellar, J.J. Lichtenberg, C.R. Corner. **Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters.** *J. Am. Water Works Assoc.*, 1974, 66(12), 703-706.
- ⁷ A.A. Stevens, J.C. Slocum, D.R. Seeger, G.G. Robeck. **Chlorination of organics in drinking water.** *J. Am. Water Works Assoc.*, 1976, 68(11), 615-620.
- ⁸ P.H. Howard, W.M. Meylan. **Handbook of physical properties of organic chemicals.** *CRC Press, Inc.*, 1997.
- ⁹ S. E. Garrido, M. G. Fonseca. **Speciation and kinetics of trihalomethanes formation in drinking water in Mexico.** *Ground Water Monit. R.*, 2010, 30(1), 77-84.
- ¹⁰ N. Thiriat, H. Paulus, B. Le Bot, P. Glorennec. **Exposure to inhaled THM: Comparison of continuous and event-specific exposure assessment for epidemiologic purposes.** *Environ. Int.*, 2009, 35, 1086-1089.
- ¹¹ Y. X. Sun, Q. Y. Wu, H. Y. Hu, J. Tian. **Effects of operating conditions on THMs and HAAs formation during wastewater chlorination.** *J. Hazard. Mater.*, 2009, 168, 1290-1295.
- ¹² A.D. Nikolaou, S.K. Golfinopoulos, T.D. Lekkas. **Formation of organic by-products during chlorination of natural waters.** *J. of Environ. Monitor.*, 2002, 4(6), 910-916.

- ¹³ J.S. Mattice, S.C. Tsai, M.B. Burch, J.J. Beauchamp. **Toxicity of trihalomethanes to common carp embryos.** *T. Am. Fish. Soc.*, 1981, 110(2), 261-269.
- ¹⁴ **Trihalomethanes in drinking-water, background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality.** *World Health Organization*, 2005.
- ¹⁵ **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide.** *World Health Organization*, 1999, 71, p. 1295, p. 1309, p. 1331.
- ¹⁶ **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances.** *World Health Organization*, 1999, Volume 73, p. 131.
- ¹⁷ T.J. Doyle, W. Zheng, J.R. Cerhan, C.P. Hong, T.A. Sellers, L.H. Kushi, A.R. Folsom. **The association of drinking water source and chlorination by-products with cancer incidence among postmenopausal women in Iowa: a prospective cohort study.** *Am. J. Public Health*, 1997, 87(7), 1168-1176.
- ¹⁸ M.D. Kramer, C.F. Lynch, P. Isacson, J.W. Hanson. **The association of waterborne chloroform with intrauterine growth retardation.** *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 1992, 3(5), 407-413.
- ¹⁹ K. Waller, S.H. Swan, G. DeLorenze, B. Hopkins. **Trihalomethanes in drinking water and spontaneous abortion.** *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 1998, 9(2), 134-140.
- ²⁰ D.A. Savitz, K.W. Andrews, L.M. Pastore. **Drinking water and pregnancy outcome in Central North Carolina: source, amount, and trihalomethane levels.** *Environ. Health Persp.*, 1995, 103(6), 592-596.
- ²¹ **National primary drinking water regulations: disinfectants and disinfection byproducts.** *Federal Register (EPA)*, 1998, 63(241), 69389-69476.
- ²² **Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.** *Official Journal of the European Communities*, 5.12.98, 330, 32-54.
- ²³ **Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.** *Boletín Oficial del Estado N°45*, viernes 21 de Febrero 2003, 3596, 7228-7245.

- ²⁴ **Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for community action in the field of water policy.** *Official Journal of the European Communities*, 22.12.2000, 327, 1-72.
- ²⁵ **Decision N° 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC.** *Official Journal of the European Communities*, 15.12.2001, 331, 1-5.
- ²⁶ L. Ritter, K.R. Solomon, J. Forget, M. Stemeroff, C. O'Leary. **Persistent Organic Pollutants Assessment Report**, IOMC, 1995.
- ²⁷ A. F. Lagalante, T. D. Oswald. **Analysis of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) by liquid chromatography with negative-ion atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry (LC/NI-APPI/MS/MS): application to house dust.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 39, 2249–2256.
- ²⁸ F. Rahman, K. H. Langford, M. D. Scrimshaw, J. N. Lester. **Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants.** *Sci. Tot. Environ.*, 2001, 275, 1-17.
- ²⁹ **Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) action plan.** *U. S. Environmental Protection Agency*, 2009.
- ³⁰ K. Ballschmiter, M. Zell. **Analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) by glass capillary gas chromatography.** *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1980, 302, 20-31
- ³¹ P. Korytár, A. Covaci, J. de Boer, A. Gelbind, U. A. Th. Brinkman. **Retention-time database of 126 polybrominated diphenyl ether congeners and two Bromkal technical mixtures on seven capillary gas chromatographic columns.** *J. Chromatogr. A*, 2005, 1065, 239-249.
- ³² A. Wong, Y. D. Lei, M. Alae, F. Wania. **Vapor Pressures of the Polybrominated Diphenyl Ethers.** *J. Chem. Eng. Data*, 2001, 46, 239-242.
- ³³ **Brominated diphenyl ethers. Environmental health criteria 162.** *World Health Organization*, 2004.
- ³⁴ C. A. de Wit. **An overview of brominated flame retardants in the environment.** *Chemosphere*, 2002, 46, 583–624.

- ³⁵ R. F. Swarthout, Jr., J. R. Kucklick, W. C. Davis. **The determination of polybrominated diphenyl ether congeners by gas chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry.** *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2008, 23, 1575-1580.
- ³⁶ M. Alaei, R. J. Wenning. **The significance of brominated flame retardants in the environment: current understanding, issues and challenges.** *Chemosphere*, 2002, 579-582.
- ³⁷ O. Andersson, G. Blomkvist. **Polybrominated aromatic pollutants found in a fish in Sweden.** *Chemosphere*, 1981, 10, 1051-1060.
- ³⁸ B. Jansson, L. Asplund, M. Olsson. **Brominated flame retardants - ubiquitous environmental pollutants?** *Chemosphere*, 1987, 16, 2343-2349.
- ³⁹ R. C. Hale, M. Alaei, J. B. Manchester-Neesvig, H. M. Stapleton, M. G. Ikonou. **Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the North American environment.** *Environ. Int.*, 2003, 29, 771-779.
- ⁴⁰ R. A. Hites. **Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: A meta-analysis of concentrations.** *Environ. Sci. Technol.*, 2004, 38 (4), 945-956.
- ⁴¹ S. P. J. van Leeuwen, M. J. M. van Velzen, C. P. Swart, I. van der Veen, W. A. Traag, J. de Boer. **Halogenated contaminants in farmed salmon, trout, tilapia, pangasius, and shrimp.** *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43 (11), 4009-4015.
- ⁴² S. Voorspoels, A. Covaci, V. L. Jaspers, H. Neels, P. Schepens. **Biomagnification of PBDEs in three small terrestrial food chains.** *Environ. Sci. Technol.*, 2007 41(2), 411-416.
- ⁴³ S. Losada, A. Roach, L. Roosens, F. J. Santos, M. T. Galceran, W. Vetter, H. Neels, A. Covaci. **Biomagnification of anthropogenic and naturally-produced organobrominated compounds in a marine food web from Sydney Harbour, Australia.** *Environ. Int.*, 2009, 35, 1142-1149.
- ⁴⁴ D. Chen, R. C. Hale, B. D. Watts, M. J. La Guardia, E. Harvey, E. K. Mojica. **Species-specific accumulation of polybrominated diphenyl ether flame retardants in birds of prey from the Chesapeake Bay region, USA.** *Environ. Pollut.*, 2010, 158, 1883-1889
- ⁴⁵ K. Norén, D. Meironyté. **Certain organochlorine and organobromine contaminants in Swedish human milk in perspective of past 20-30 years.** *Chemosphere*, 2000, 40, 1111-1123.

- ⁴⁶ L. M. L. Toms, L. Hearn, K. Kennedy, F. Harden, M. Bartkow, C. Temme, J. F. Mueller. **Concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in matched samples of human milk, dust and indoor air.** *Environ. Int.*, 2009, 35, 864-869.
- ⁴⁷ A. Schechter, N. Shah, J. A. Colacino, S. I. Brummitt, V. Ramakrishnan, T. R. Harris, O. Pöpke. **PBDEs in US and German clothes dryer lint: A potential source of indoor contamination and exposure.** *Chemosphere*, 2009, 75, 623-628.
- ⁴⁸ S. Harrad, L. Porter. **Concentrations of polybrominated diphenyl ethers in blood serum from New Zealand.** *Chemosphere*, 2007, 66, 2019-2023.
- ⁴⁹ A. Sjödin, L. Y. Wong, R. S. Jones, A. Park, Y. Zhang, C. Hodge, E. DiPietro, C. McClure, W. Turner, L. L. Needham, D. G. Patterson Jr. **Serum concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polybrominated biphenyl (PBB) in the United States Population: 2003–2004.** *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42 (4), 1377–1384.
- ⁵⁰ H. A. Chao, S. C. C. Chen, C. M. Chang, T. W. Koh, G. P. Chang-Chien, E. Ouyang, S. L. Lin, C. G. Shy, F. A. Chen, H. R. Chao. **Concentrations of polybrominated diphenyl ethers in breast milk correlated to maternal age, education level, and occupational exposure.** *J. Hazard. Mater.*, 2010, 175, 492-500.
- ⁵¹ M. Schuhmacher, H. Kiviranta, P. Ruokojärvi, M. Nadal, J. L. Domingo. **Concentrations of PCDD/Fs, PCBs and PBDEs in breast milk of women from Catalonia, Spain: A follow-up study.** *Environ. Int.*, 2009, 35, 607–613
- ⁵² A. Covaci, J. de Boer, J. J. Ryan, S. Voorspoels, P. Schepens. **Distribution of organobrominated and organochlorinated contaminants in Belgian human adipose tissue.** *Environ. Res.*, 2002, 88, 210-218.
- ⁵³ M.F. Fernandez, P. Araque, H. Kiviranta, J.M. Molina-Molina, P. Rantakokko, O. Laine, T. Vartiainen, N. Olea. **PBDEs and PBBs in the adipose tissue of women from Spain.** *Chemosphere*, 2007, 66, 377-383.
- ⁵⁴ **Toxicological profile for polybrominated diphenyl ethers and polybrominated biphenyls.** *Agency for Toxic Substances and Disease Registry (U.S. Department of Health and Human Services)*, 2004.
- ⁵⁵ B. Gómara, L. Herrero, J. J. Ramos, J. R. Mateo, M. A. Fernández, J. F. García, and M. J. González. **Distribution of polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord**

serum, paternal serum, maternal serum, placentas, and breast milk from Madrid population, Spain. *Environ. Sci. Technol.*, 2007, 41, 6961-6968.

⁵⁶ G. Söderström, U. Sellström, C. A. De Wit, M. Tysklind. **Photolytic debromination of decabromodiphenyl ether (BDE 209).** *Environ. Sci. Technol.*, 2004, 38, 127-132.

⁵⁷ D. F. Staskal, H. Hakk, D. Bauer, J. J. Diliberto, L. S. Birnbaum. **Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners 47, 99, 100, and 153 in mice.** *Toxicol. Sci.*, 2006, 94 (1), 28-37.

⁵⁸ H. M. Stapleton, S. M. Kelly, R. Pei, R. J. Letcher, C. Gunsch. **Metabolism of polybrominated diphenyl Ethers (PBDEs) by human hepatocytes in vitro.** *Environ. Health Persp.*, 2009, 117(2), 197-202.

⁵⁹ P. D. Noyes, S. M. Kelly, C. L. Mitchelmore, H. M. Stapleton. **Characterizing the in vitro hepatic biotransformation of the flame retardant BDE 99 by common carp.** *Aquat. Toxicol.*, 2010, 97, 142-150.

⁶⁰ X. Qiu, R. M. Bigsby, R. A. Hites. **Hydroxylated metabolites of polybrominated diphenyl ethers in human blood samples from the United States.** *Environ. Health Persp.*, 2009, 117(1), 93-98.

⁶¹ Y. Wan, S. Wiseman, H. Chang, X. Zhang, P. D. Jones, M. Hecker, K. Kannan, S. Tanabe, J. Hu, M. H. W. Lam, J. P. Giesy. **Origin of hydroxylated brominated diphenyl ethers: Natural compounds or man-made flame retardants?** *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43, 7536-7542.

⁶² **Toxicological review of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenylether (BDE-47).** U.S. Environmental Protection Agency, 2008.

⁶³ **Toxicological review of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenylether (BDE-99).** U.S. Environmental Protection Agency, 2008.

⁶⁴ **Toxicological review of 2,2',4,4',5,5'-hexabromodiphenylether (BDE-153).** U.S. Environmental Protection Agency, 2008.

⁶⁵ P. O. Darnerud, G. S. Eriksen, T. Jóhannesson, P. B. Larsen, M. Viluksela. **Polybrominated diphenyl ethers: Occurrence, dietary exposure, and toxicology.** *Environ. Health Perspect.*, 2001, 109 (suppl 1), 49-68.

- ⁶⁶ J. Legler. **New insights into the endocrine disrupting effects of brominated flame retardants.** *Chemosphere*, 2008, 73, 216-222.
- ⁶⁷ S. N. Kuriyama, A. Wanner, A. A. Fidalgo-Neto, C. E. Talsness, W. Koerner, I. Chahoud. **Developmental exposure to low-dose PBDE-99: Tissue distribution and thyroid hormone levels.** *Toxicology*, 2007, 242, 80-90.
- ⁶⁸ T. A. McDonald. **A perspective on the potential health risks of PBDEs.** *Chemosphere*, 2002, 46, 745-755.
- ⁶⁹ I. A. T. M. Meerts, J. J. van Zanden, E. A. C. Luijckx, I. van Leeuwen-Bol, G. Marsh, E. Jakobsson, Å. Bergman, A. Brouwer. **Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro.** *Toxicol. Sci.*, 2000, 56, 95-104.
- ⁷⁰ J. Cao, Y. Lin, L. H. Guo, A. Q. Zhang, Y. Wei, Y. Yang. **Structure-based investigation on the binding interaction of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers with thyroxine transport proteins.** *Toxicology*, 2010, 277, 20-28
- ⁷¹ T. E. Stoker, S. C. Laws, K. M. Crofton, J. M. Hedge, J. M. Ferrell, R. L. Cooper. **Assessment of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture, in the EDSP male and female pubertal protocols.** *Toxicol. Sci.*, 2004, 78, 144-155.
- ⁷² D.T. Szabo, V.M. Richardson, D.G. Ross, J.J. Diliberto, P.R. Kodavanti and L.S. Birnbaum. **Effects of perinatal PBDE exposure on hepatic phase I, phase II, phase III, and deiodinase 1 gene expression involved in thyroid hormone metabolism in male rat pups.** *Toxicol. Sci.*, 2009, 107, 27-39.
- ⁷³ L. G. Costa, G. Giordano, S. Tagliaferri, A. Caglieri, A. Mutti. **Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects.** *Acta Biomed.*, 2008, 79, 172-183. **3**
- ⁷⁴ M. H. A. Kester, S. Bulduk, H. van Toor, D. Tibboel, W. Meinel, H. Glatt, C. N. Falany, M. W. H. Coughtrie, A. G. Schuur, A. Brouwer, T. J. Visser. **Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disrupters.** *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(3), 1142-1150.

- ⁷⁵ T. Hamers, J. H. Kamstra, E. Sonneveld, A. J. Murk, M. H. A. Kester, P. L. Andersson, J. Legler, A. Brouwer. **In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants.** *Toxicol. Sci.*, 2006, 92(1), 157-173.
- ⁷⁶ P. R. S. Kodavanti, C. G. Coburn, V. C. Moser, R. C. MacPhail, S. E. Fenton, T. E. Stoker, J. L. Rayner, K. Kannan, L. S. Birnbaum. **Developmental exposure to a commercial PBDE mixture, DE-71: neurobehavioral, hormonal, and reproductive effects.** *Toxicol. Sci.*, 2010, 116 (1), 297-312.
- ⁷⁷ S. C. Martenson, D. M. Bird, J. L. Shutt, R. J. Letcher, I. J. Ritchie, K. J. Fernie. **Multi-generational effects of polybrominated diphenylethers exposure: embryonic exposure of male American kestrels (*Falco sparverius*) to DE-71 alters reproductive success and behaviors.** *Environ. Toxicol. Chem.*, 2010, 29 (8), 1740-1747.
- ⁷⁸ N. Johansson, H. Viberg, A. Fredriksson, P. Eriksson. **Neonatal exposure to decabrominated diphenyl ether (PBDE 209) causes dose-response changes in spontaneous behaviour and cholinergic susceptibility in adult mice.** *Neurotoxicology*, 2008, 29, 911-919.
- ⁷⁹ **Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) project plan.** *U. S. Environmental Protection Agency*, 2006.
- ⁸⁰ R. V. Kuiper, A. J. Murk, P. E. G. Leonards, G. C. M. Grinwis, M. van den Berg, J. G. Vos. **In vivo and in vitro Ah-receptor activation by commercial and fractionated pentabromodiphenylether using zebrafish (*Danio rerio*) and the DR-CALUX assay.** *Aquat. Toxicol.*, 2006, 79, 366-375.
- ⁸¹ J. L. Domingo, A. Bocio, G. Falcó, J. M. Llobet. **Exposure to PBDEs and PCDEs associated with the consumption of edible marine species.** *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40, 4394-4399.
- ⁸² **Toxicology and carcinogenesis studies of decabromodiphenyl oxide (CAS No 1163-19-5) in R344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies).** *NTP Technical Report Series no 309*, Research Triangle Park, NC: National Toxicology Program, 1986.
- ⁸³ **Council Directive of 27 July 1976 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (76/769/EEC).** *Official Journal of the European Union*, 27.09.1976, 262, 201-203.

⁸⁴ Directive 2003/11/EC of the European Parliament and of the Council of 6 February 2003 amending for the 24th time Council Directive 76/769/EEC relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (pentabromodiphenyl ether, octabromodiphenyl ether). *Official Journal of the European Union*, 15.2.2003, 42, 45-46.

⁸⁵ Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal of the European Union*, 30.12.2006, 396, 1-849.

⁸⁶ Corrigendum to Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/45/EC and repealing Council Regulation (EEC) No 793/93 and Commission Regulation (EC) No 1488/94 as well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC. *Official Journal of the European Union*, 29.5.2007, 136, 3-280.

⁸⁷ Commission Regulation (EC) No 552/2009 of 22 June 2009 amending Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards Annex XVII. *Official Journal of the European Union*, 26.6.2009, 164, 7-31.

⁸⁸ Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment. *Official Journal of the European Union*, 13.2.2003, 37, 19-24.

⁸⁹ Commission Decision of 18 August 2005 amending Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council for the purpose of establishing the maximum concentration values for certain hazardous substances in electrical and electronic equipment. *Official Journal of the European Union*, 19.8.2005, 214, 65.

- ⁹⁰ **Directive 2002/96/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 on waste electrical and electronic equipment.** *Official Journal of the European Union*, 13.2.2003, 37, 24-38.
- ⁹¹ **Real Decreto 208/2005, de 25 de febrero, sobre aparatos eléctricos y electrónicos y la gestión de sus residuos.** *Boletín Oficial del Estado N°49*, sábado 26 de Febrero 2005, 3242, 7112-7121.
- ⁹² **Regulation (EC) No 166/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 January 2006 concerning the establishment of a European Pollutant Release and Transfer Register and amending Council Directives 91/689/EEC and 96/61/EC.** *Official Journal of the European Communities*, 4.2.2006, 33, 1-17.
- ⁹³ **Real Decreto 508/2007, de 20 de abril, por el que se regula el suministro de información sobre emisiones del Reglamento E-PRTR y de las autorizaciones ambientales integradas.** *Boletín Oficial del Estado N°96*, sábado 21 de Abril 2007, 8351, 17686-17703.
- ⁹⁴ **Decision No 2455/2001/EC of the European Parliament and of the Council of 20 November 2001 establishing the list of priority substances in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC.** *Official Journal of the European Communities*, 15.12.2001, 331, 1-5.
- ⁹⁵ **Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council.** *Official Journal of the European Union*, 24.12.2008, 348, 84-97.
- ⁹⁶ **Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Guidance on chemical monitoring of sediment and biota under the Water Framework Directive.** Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, 2010. ISBN 978-92-79-16224-4, DOI 10.2779/43586.
- ⁹⁷ **Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive. Technical guidance for deriving Environmental Quality Standards (TGD-EQS).** 23 february 2010, final draft.
- ⁹⁸ **Ley 62/2003 de 30 de diciembre, de medidas fiscales, administrativas y del orden social.** *Boletín Oficial del Estado N°313*, miércoles 31 de diciembre 2003, 23936, 46874-46962.

⁹⁹ **Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas.** *Boletín Oficial del Estado* N°176, martes 24 de julio 2001, 14276, 26791-26817.

¹⁰⁰ **Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas.** *Boletín Oficial del Estado* N°19, sábado 22 de enero 2011, 1139, 6854-6870.

¹⁰¹ **Commission Directive 2009/90/EC of 31 July 2009 laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status.** *Official Journal of the European Union*, 1.8.2009, 201, 36-38.

¹⁰² P. Guerra, E. Eljarrat, D. Barceló. **Analysis and occurrence of emerging brominated flame retardants in the Llobregat River basin.** *J. Hydrol.*, 2010, 383, 39-43.

¹⁰³ R. Montes, I. Rodríguez, R. Cela. **Solid-phase microextraction with simultaneous oxidative sample treatment for the sensitive determination of tetra- to hexa-brominated diphenyl ethers in sediments.** *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 14-21.

¹⁰⁴ **Substituting Environmentally Relevant Flame Retardants: Assessment Fundamentals. Results and summary overview.** Federal Environmental Agency (*Umweltbundesamt*), Berlín, 2001.

¹⁰⁵ **Guidance on flame retardant alternatives to pentabromodiphenyl ether (PentaBDE).** *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (UNEP)*, 2009.

¹⁰⁶ **Alternatives to Deca-BDE in Televisions and Computers and Residential Upholstered Furniture.** *Department of Ecology State Washington*, 2008.

¹⁰⁷ **Report on Alternatives to the Flame Retardant DecaBDE : Evaluation of Toxicity, Availability, Affordability and Fire Safety Issues.** *Illinois Environmental Protection Agency*, 2007.

¹⁰⁸ **Survey and technical assessment of alternatives to Decabromodiphenyl ether (decaBDE) in plastics.** *The Swedish Chemicals Inspectorate*, 2005.

¹⁰⁹ **Environment Project no.1141. Deca-BDE and Alternatives in Electrical and Electronic Equipment.** *Danish Environmental Protection Agency*, 2006.

- ¹¹⁰ **Working report nr. 17. Alternatives to brominated flame retardants. Screening for environmental and health data.** *Danish Environmental Protection Agency*, 2000.
- ¹¹¹ A. Nikolaou, S. Golfinopoulos, L. Rizzo, G. Lofrano, T. Lekkas, V. Belgiomo. **Optimization of analytical methods for the determination of DBPs: Application to drinking waters from Greece and Italy.** *Desalination*, 2005, 176, 25-36.
- ¹¹² S. K. Golfinopoulos, A. D. Nikolaou. **Survey of disinfection by-products in drinking water in Athens, Greece.** *Desalination*, 2005, 176, 13-24.
- ¹¹³ S. V. Leivadara, A. D. Nikolaou, T. D. Lekkas. **Determination of organic compounds in bottled waters.** *Food Chem.*, 2008, 108, 277-286.
- ¹¹⁴ A. Hasan, N. P. Thacker, J. Bassin. **Trihalomethane formation potential in treated water supplies in urban metro city.** *Environ. Monit. Assess.*, 2010, 168, 489-497.
- ¹¹⁵ M. Ma, F. F. Cantwell. **Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: preconcentration into a single microdrop.** *Anal. Chem.*, 1999, 71, 388-393.
- ¹¹⁶ M. Rezaee, Y. Assadi, M-R. M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadian, S. Berijani. **Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction.** *J. Chromatogr. A*, 2006, 1116, 1-9.
- ¹¹⁷ S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen. **Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis.** *Anal. Chem.*, 1999, 71, 2650-2656
- ¹¹⁸ K. E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, M. Krogh, H. G. Uglund, T. Grønhaug. **Development of a simple in-vial liquid-phase microextraction device for drug analysis compatible with capillary gas chromatography, capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography.** *J. Chromatogr. A*, 2000, 873, 3-11.
- ¹¹⁹ M. Culea, O. Cozar, D. Ristoiu. **Methods validation for the determination of trihalomethanes in drinking water.** *J. Mass Spectrom.*, 2006, 41, 1594-1597.
- ¹²⁰ N. Vora-adisak, P. Varanusupakul. **A simple supported liquid hollow fiber membrane microextraction for sample preparation of trihalomethanes in water samples.** *J. Chromatogr. A*, 2006, 1121, 236-241.

- ¹²¹ A. Tor, M. E. Aydin. **Application of liquid-phase microextraction to the analysis of trihalomethanes in water.** *Anal.Chim. Acta.*, 2006, 575, 138-143.
- ¹²² R. R. Kozani, Y. Assadi, F. Shemirani, M. R. M Hosseini, M. R. Jamali. **Determination of trihalomethanes in drinking water by dispersive liquid-liquid microextraction then gas chromatography with electron-capture detection.** *Chromatographia*, 2007, 66, 81-86.
- ¹²³ E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel. **Determination of trihalomethanes in waters by ionic liquid-based single drop microextraction/gas chromatographic/mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2008, 1209, 76-82.
- ¹²⁴ N. Jakubowska, Ż. Polkowska, W. Kujawski, P. Konieczka, J. Namieśnik. **A comparison of three solvent-free techniques coupled with gas chromatography for determining trihalomethanes in urine samples.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 691-698.
- ¹²⁵ E. Jávorszky, G. Erdoedy, K. Torkos. **The choice of internal standards for measuring volatile pollutants in water.** *Chromatographia*, 2006, 63, S55-S60
- ¹²⁶ J. Caro, A. Serrano, M. Gallego. **Direct screening and confirmation of priority volatile organic pollutants in drinking water.** *J. Chromatogr. A*, 2007, 1138, 244-250.
- ¹²⁷ A. Serrano, M. Gallego. **Rapid determination of total trihalomethanes index in drinking water.** *J. Chromatogr. A*, 2007, 1154, 26-33.
- ¹²⁸ J. Caro, A. Serrano, M. Gallego. **Sensitive headspace gas chromatography-mass spectrometry determination of trihalomethanes in urine.** *J. Chromatogr. B*, 2007, 848, 277-282.
- ¹²⁹ J. L. Pérez Pavón, S. Herrero Martín, C. García Pinto, B. Moreno Cordero. **Headspace-programmed temperature vaporizer-fast gas chromatography-mass spectrometry coupling for the determination of trihalomethanes in water.** *J. Chromatogr. A*, 2008, 1194, 103-110.
- ¹³⁰ R.-X. Hao, H.-W.Wan, Q.-K. Zhang, Z.-Z. Ma, F. Liu, D.-W.Zhou. **Headspace-GC-MS- Σ SIM analysis of the THMs in reclaimed water.** *J. Univ. Sci. Technol. B*. 2011, 37(2), 243-248.
- ¹³¹ T. Huybrechts, J. Dewulf, O. Moerman, H. Van Langenhove. **Evaluation of purge-and-trap high-resolution gas chromatography mass spectrometry for the determination of 27**

- volatile organic compounds in marine water at the ng l⁻¹ concentration level.** *J. Chromatogr. A*, 2000, 893, 367-382.
- ¹³² A.S. Allonier, M. Khalanski, A. Bermond, V. Camel. **Determination of trihalomethanes in chlorinated sea water samples using a purge-and-trap system coupled to gas chromatography.** *Talanta*, 2000, 51, 467-477.
- ¹³³ E. Martínez, S. Lacorte, I. Llobet, P. Viana, D. Barceló. **Multicomponent analysis of volatile organic compounds in water by automated purge and trap coupled to gas chromatography-mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2002, 959, 181-190.
- ¹³⁴ N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, N. Aguinaga, M. Hernández-Córdoba. **Purge-and-trap capillary gas chromatography with atomic emission detection for volatile halogenated organic compounds determination in waters and beverages.** *J. Chromatogr. A*, 2004, 1035, 1-8.
- ¹³⁵ L. Zoccolillo, L. Amendola, C. Cafaro, S. Insogna. **Improved analysis of volatile halogenated hydrocarbons in water by purge-and-trap with gas chromatography and mass spectrometric detection.** *J. Chromatogr. A.*, 2005, 1077, 181-187.
- ¹³⁶ F. Ruiz-Bevia, M. J. Fernandez-Torres, M. P. Blasco-Aleman. **Purge efficiency in the determination of trihalomethanes in water by purge-and-trap gas chromatography.** *Anal. Chim. Acta*, 2009, 632, 304-314.
- ¹³⁷ A. Ikem. **Measurement of volatile organic compounds in bottled and tap waters by purge and trap GC-MS: Are drinking water types different?** *J. Food Compos. Anal.*, 2010, 23, 70-77.
- ¹³⁸ D. Budziak, L. Richard Jr., E. Beltrame, E. Carasek. **Monitoring the formation of trihalomethanes in the effluents from a shrimp hatchery.** *Environ. Monit. Assess.*, 2007, 127, 435-444.
- ¹³⁹ M. A. Brown, S. Miller, G. L. Emmert. **On-line purge and trap gas chromatography for monitoring of trihalomethanes in drinking water distribution systems.** *Anal. Chim. Acta*, 2007, 592, 154-161.
- ¹⁴⁰ D. Budziak, E. Carasek. **Determination of Trihalomethanes in Drinking Water from Three Different Water Sources in Florianopolis-Brazil using Purge and Trap and Gas Chromatography.** *J. Braz. Chem. Soc.*, 2007, 18(4), 741-747.

- ¹⁴¹ A. Lara-Gonzalo, J. E. Sánchez-Uría, E. Segovia-García, A. Sanz-Medel. **Critical comparison of automated purge and trap and solid-phase microextraction for routine determination of volatile organic compounds in drinking waters by GC-MS.** *Talanta*, 2008, 74, 1455-1462.
- ¹⁴² E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers. **Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles.** *J. Microcolumn Sep.*, 1999, 11, 737-747.
- ¹⁴³ N. Jakubowska, B. Henkelmann, K.-W. Schramm, J. Namiesnik. **Optimization of a novel procedure for determination of VOCs in water and human urine samples based on SBSE coupled with TD-GC-HRMS.** *J. Chromatogr. Sci.*, 2009, 47 (8), 689-693
- ¹⁴⁴ S. Nakamura, S. Daishima. **Simultaneous determination of 22 volatile organic compounds, methyl-tert-butyl ether, 1,4-dioxane, 2-methylisoborneol and geosmin in water by headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry.** *Anal. Chim. Acta*, 2005, 548, 79-85.
- ¹⁴⁵ C. V. Antoniou, E. E. Koukouraki, E. Diamadopoulos. **Determination of chlorinated volatile organic compounds in water and municipal wastewater using headspace-solid phase microextraction-gas chromatography.** *J. Chromatogr. A*, 2006, 1132, 310-314.
- ¹⁴⁶ S.-C. Soh, Md. P. Abdullah. **Determination of volatile organic compounds pollution sources in malaysian drinking water using multivariate analysis.** *Environ. Monit. Assess.*, 2007, 124, 39-50.
- ¹⁴⁷ P. M. San Juan, J. D. Carrillo, M. T. Tena. **Fibre selection based on an overall analytical feature comparison for the solid-phase microextraction of trihalomethanes from drinking water.** *J. Chromatogr. A*, 2007, 1139, 27-35.
- ¹⁴⁸ A. D. Guimares, J. J. Carvalho, C. Gonçalves, M. F. Alpendurada. **Simultaneous analysis of 23 priority volatile compounds in water by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and estimation of the method's uncertainty.** *Int. J. Environ. An. Ch.*, 2008, 88(3), 151-164.
- ¹⁴⁹ M. Bahri, M.R. Driss. **Development of solid-phase microextraction for the determination of trihalomethanes in drinking water from Bizerte, Tunisia.** *Desalination*, 2010, 250, 414-417.

- ¹⁵⁰ M. S. Dos Santos, E. Martendal, E. Carasek. **Determination of THMs in soft drink by solid-phase microextraction and gas chromatography.** *Food Chem.*, 2011, 127, 290-295.
- ¹⁵¹ M. Marczak, L. Wolska, W. Chrzanowski, J. Namieśnik. **Microanalysis of Volatile Organic Compounds (VOCs) in Water Samples - Methods and Instruments.** *Microchim. Acta*, 2006, 155, 331-348.
- ¹⁵² B. Buszewski, T. Ligor. **Application of Different Extraction Methods for the Quality Control of Water.** *Water Air Soil Pollut.*, 2001, 129, 155-165.
- ¹⁵³ Z. Polkowska. **Determination of volatile organohalogen compounds in urban precipitation in Tricity area (Gdańsk, Gdynia, Sopot).** *Chemosphere*, 2004, 57, 1265-1274.
- ¹⁵⁴ M. Tobiszewski, J. Namieśnik. **Determination of chlorinated solvents in industrial water and wastewater by DAI-GC-ECD.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, 3565-3572.
- ¹⁵⁵ C. Aeppli, M. Berg, T.B. Hofstetter, R. Kipfer, R.P. Schwarzenbach. **Simultaneous quantification of polar and non-polar volatile organic compounds in water samples by direct aqueous injection-gas chromatography/mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2008, 1181, 116-124.
- ¹⁵⁶ G. L. Emmert, M. A. Brown, Z. Liao, G. Cao y C. Duty. **Supported Capillary Membrane Sampling-Gas Chromatography on a Valve with a Pulsed Discharge Photoionization Detector.** *Anal. Chim. Acta*, 2006, 560, 197-206.
- ¹⁵⁷ M. A. Brown, G. L. Emmert. **On-line monitoring of trihalomethane concentrations in drinking water distribution systems using capillary membrane sampling-gas chromatography.** *Anal. Chim. Acta*, 2006, 555, 75-83.
- ¹⁵⁸ A. Covaci, S. Voorspoels. **Optimization of the determination of polybrominated diphenyl ethers in human serum using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry.** *J. Chromatogr. B*, 2005, 827, 216-223.
- ¹⁵⁹ C. Thomsen, V. Horpestad Liane, G. Becher. **Automated solid-phase extraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in serum – application on archived Norwegian samples from 1977 to 2003.** *J. Chromatogr. B*, 2007, 846, 252-263.

- ¹⁶⁰ Y. Li, G. Wei, J. Hu, X. Liu, X. Zhao, X. Wang. **Dispersive liquid-liquid microextraction followed by reversed phase-high performance liquid chromatography for the determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in landfill leachate and environmental water samples.** *Anal. Chim. Acta*, 2008, 615, 96-103.
- ¹⁶¹ A. R. Fontana, R. G. Wuilloud, L. D. Martínez J. C. Altamirano. **Simple approach based on ultrasound-assisted emulsification-microextraction for determination of polibrominated flame retardants in water samples by gas chromatography-mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 147-153.
- ¹⁶² A. R. Fontana, M. F. Silva, L. D. Martínez, R. G. Wuilloud, J. C. Altamirano. **Determination of polybrominated diphenyl ethers in water and soil samples by cloud point extraction-ultrasound-assisted back-extraction-gas chromatography-mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 4339-4346.
- ¹⁶³ A. Bacaloni, L. Callipo, E. Corradini, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Laganà. **Liquid chromatography-negative ion atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry for the determination of brominated flame retardants in environmental water and industrial effluents.** *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 6400-6409.
- ¹⁶⁴ P. Labadie, K. Tlili, F. Alliot, C. Bourges, A. Desportes, M. Chevreuril. **Development of analytical procedures for trace-level determination of polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A in river water and sediment.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 396, 865-875.
- ¹⁶⁵ A. Prieto, O. Telleria, N. Etxebarria, L.A. Fernández, A. Usobiaga, O. Zuloaga. **Simultaneous preconcentration of a wide variety of organic pollutants in water samples Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction.** *J. Chromatogr. A*, 2008, 1214, 1-10.
- ¹⁶⁶ M. Karlsson, A. Julander, B. van Bavel, G. Lindström. **Solid-phase extraction of polybrominated diphenyl ethers in human plasma - comparison with an open column extraction method.** *Chromatographia*, 2005, 61, 67-73.
- ¹⁶⁷ Z. Zhang, S. M. Rhind. **Optimized determination of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in sheep serum by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry.** *Talanta*, 2011, 84, 487-493.

- ¹⁶⁸ A. Covaci, A. Gheorghe, S. Voorspoels, J. Maervoet, E. Steen Redeker, R. Blust, P. Schepens. **Polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in sediment cores from the Western Scheldt river (Belgium): analytical aspects and depth profiles.** *Environ. Int.*, 2005, 31, 367–375.
- ¹⁶⁹ J. Ma, R. Addink, S. Yun, J. Cheng, W. Wang, K. Kannan. **Polybrominated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans and polybrominated diphenyl ethers in soil, vegetation, workshop-floor dust, and electronic shredder residue from an electronic waste recycling facility and in soils from a chemical industrial complex in Eastern China.** *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43, 7350–7356.
- ¹⁷⁰ J. Zhou, F. Yang, D. Cha, Z. Zeng, Y. Xu. **Headspace solid-phase microextraction with novel sol-gel permethylated- β -cyclodextrin/hydroxyl-termination silicone oil fiber for determination of polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography-mass spectrometry in soil.** *Talanta*, 2007, 73, 870–877.
- ¹⁷¹ C. Salgado-Petinal, M. Llompart, C. García-Jares, M. García-Chao, R. Cela. **Simple approach for the determination of brominated flame retardants in environmental solid samples based on solvent extraction and solid-phase microextraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2006, 1124, 139–147.
- ¹⁷² A. R. Fontana, N. B. Lana, L. D. Martinez, J. C. Altamirano. **Ultrasound-assisted leaching-dispersive solid-phase extraction followed by liquid-liquid microextraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in sediment samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry.** *Talanta*, 2010, 82, 359–366.
- ¹⁷³ X. Liu, J. Hu, C. Huang¹, H. Wang, X. Wang. **Determination of polybrominated diphenyl ethers in aquatic animal tissue using cleanup by freezing-dispersive liquid-liquid microextraction combined with GC-MS.** *J. Sep. Sci.*, 2009, 32, 4213–4219.
- ¹⁷⁴ J.-H. Peng, C.-W. Huang, Y.-M. Weng, H.-K. Yak. **Determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in fish samples from rivers and estuaries in Taiwan.** *Chemosphere*, 2007, 66, 1990–1997.
- ¹⁷⁵ Q. Luo, M. Wong, Z. Cai. **Determination of polybrominated diphenyl ethers in freshwater fishes from a river polluted by e-wastes.** *Talanta*, 2007, 72, 1644–1649.
- ¹⁷⁶ E. Eljarrat, A. de la Cal, D. Raldua, C. Duran, D. Barcelo. **Brominated flame retardants in *Alburnus alburnus* from Cinca River Basin (Spain).** *Environ. Pollut.*, 2005, 133, 501–508.

- ¹⁷⁷ S. Lacorte, M. Guillamon. **Validation of a pressurized solvent extraction and GC-NCI-MS method for the low level determination of 40 polybrominated diphenyl ethers in mothers' milk.** *Chemosphere*, 2008, 73, 70–75.
- ¹⁷⁸ G. Mascolo, V. Locaputo, G. Mininni. **New perspective on the determination of flame retardants in sewage sludge by using ultrahigh pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry with different ion sources.** *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 4601–4611.
- ¹⁷⁹ S. Losada, F.J. Santos, A. Covaci, M.T. Galceran. **Gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry method for the analysis of methoxylated polybrominated diphenyl ethers in fish.** *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 5253–5260.
- ¹⁸⁰ S. Losada, J. Parera, M. Abalos, E. Abad, F.J. Santos, M.T. Galceran. **Suitability of selective pressurized liquid extraction combined with gas chromatography–ion-trap tandem mass spectrometry for the analysis of polybrominated diphenyl ethers.** *Anal. Chim. Acta*, 2010, 678, 73–81.
- ¹⁸¹ Z. Zhang, E. Ohiozebau, S. M. Rhind. **Simultaneous extraction and clean-up of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls from sheep liver tissue by selective pressurized liquid extraction and analysis by gas chromatography–mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 1203–1209.
- ¹⁸² P. López, S. H. Brandsma, P. E. G. Leonards, J. de Boer. **Optimization and development of analytical methods for the determination of new brominated flame retardants and polybrominated diphenyl ethers in sediments and suspended particulate matter.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400, 871–883.
- ¹⁸³ V. Yusà, O. Pardo, A. Pastor, M. de la Guardia. **Optimization of a microwave-assisted extraction large-volume injection and gas chromatography–ion trap mass spectrometry procedure for the determination of polybrominated diphenyl ethers, polybrominated biphenyls and polychlorinated naphthalenes in sediments.** *Anal. Chim. Acta*, 2006, 557, 304–313.
- ¹⁸⁴ P. Labadie, F. Alliot, C. Bourges, A. Desportes, Marc Chevreuil. **Determination of polybrominated diphenyl ethers in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry: Case study on European eel (*Anguilla anguilla*) from Mediterranean coastal lagoons.** *Anal. Chim. Acta*, 2010, 675, 97–105.

- ¹⁸⁵ C. M. Medina, E. Pitarch, F. J. López, C. Vázquez, F. Hernández. **Determination of PBDEs in human breast adipose tissues by gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 390, 1343–1354.
- ¹⁸⁶ S. L. Blanco, J. M. Vieites. **Single-run determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) di- to deca-brominated in fish meal, fish oil and fish feed by isotope dilution: Application of automated sample purification and gas chromatography/ion trap tandem mass spectrometry (GC/ITMS).** *Anal. Chim. Acta*, 2010, 672, 137–146.
- ¹⁸⁷ D. Wang, Z. Cai, G. Jiang, A. Leung, M. H. Wong, W. K. Wong. **Determination of polybrominated diphenyl ethers in soil and sediment from an electronic waste recycling facility.** *Chemosphere*, 2005, 60, 810–816.
- ¹⁸⁸ H.M. Stapleton, N.G. Dodder, J.R. Kucklick, C.M. Reddy, M.M. Schantz, P.R. Becker, F. Gulland, B.J. Porter, S.A. Wise. **Determination of HBCD, PBDEs and MeO-BDEs in California sea lions (*Zalophus californianus*) stranded between 1993 and 2003.** *Mar. Pollut. Bull.*, 2006, 52, 522–531.
- ¹⁸⁹ Q. Q. Li, A. Loganath, Y. S. Chong, J. P. Obbard. **Determination and occurrence of polybrominated diphenyl ethers in maternal adipose tissue from inhabitants of Singapore.** *J. Chromatogr. B*, 2005, 819, 253–257.
- ¹⁹⁰ M. Shin, M. L. Svoboda, P. Falletta. **Microwave-assisted extraction (MAE) for the determination of polybrominated diphenylethers (PBDEs) in sewage sludge.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387, 2923–2929.
- ¹⁹¹ J. Regueiro, M. Llompарт, C. Garcia-Jares, R. Cela. **Factorial-design optimization of gas chromatographic analysis of tetrabrominated to decabrominated diphenyl ethers. Application to domestic dust.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 1095–1107.
- ¹⁹² A. R. Fontana, A. Camargo, L. D. Martinez, J. C. Altamirano. **Dispersive solid-phase extraction as a simplified clean-up technique for biological sample extracts. Determination of polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography–tandem mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2011, 1218, 2490–2496.
- ¹⁹³ R. Cariou, J.-P. Antignac, P. Marchand, A. Berrebi, D. Zalko, F. Andre, B. Le Bizec. **New multiresidue analytical method dedicated to trace level measurement of brominated flame retardants in human biological matrices.** *J. Chromatogr. A*, 2005, 1100, 144–152.

¹⁹⁴ N. Fontanals, T. Barri, S. Bergström, J.-A. Jönsson. **Determination of polybrominated diphenyl ethers at trace levels in environmental waters using hollow-fiber microporous membrane liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2006, 1133, 41-48.

¹⁹⁵ Q. Xiao, B. Hu, J. Duan, M. He, W. Zu. **Analysis of PBDEs in soil, dust, spiked lake water, and human serum samples by hollow fiber-liquid phase microextraction combined with GC-ICP-MS.** *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2007, 18, 1740-1748.

¹⁹⁶ A. R. Fontana, M. F. Silva, L. D. Martínez, R. G. Wuilloud, J. C. Altamirano. **Determination of polybrominated diphenyl ethers in water and soil samples by cloud point extraction - ultrasound - assisted back - extraction - gas chromatography - mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 4339-4346.

¹⁹⁷ B. Gómara, L. Herrero, M. J. González. **Feasibility of electron impact and electron capture negative ionization mass spectrometry for the trace determination of tri- to decabrominated diphenyl ethers in human samples.** *Anal. Chim. Acta*, 2007, 597, 121-128.

¹⁹⁸ J.J. Ramos, B. Gómara, M.A. Fernández, M.J. González. **A simple and fast method for the simultaneous determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in small volumes of human serum.** *J. Chromatogr. A*, 2007, 1152, 124-129.

¹⁹⁹ R. Quiroz, L. Arellano, J. O. Grimalt, P. Fernández. **Analysis of polybrominated diphenyl ethers in atmospheric deposition and snow samples by solid-phase disk extraction.** *J. Chromatogr. A*, 2008, 1192, 147-151.

²⁰⁰ J. Sánchez-Avila, J. Bonet, G. Velasco, Silvia Lacorte. **Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PAHs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant.** *Sci. Total Environ.*, 2009, 407, 4157-4167.

²⁰¹ J.-X. Wang, D.-Q. Jiang, Z.-Y. Gu, X.-P. Yan. **Multiwalled carbon nanotubes coated fibers for solid-phase microextraction of polybrominated diphenyl ethers in water and milk samples before gas chromatography with electron-capture detection.** *J. Chromatogr. A*, 2006, 1137, 8-14.

²⁰² P. Serôdio, M. S. Cabral, J. M. F. Nogueira. **Use of experimental design in the optimization of stir bar sorptive extraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in environmental matrices.** *J. Chromatogr. A*, 2007, 1141, 259-270.

- ²⁰³ A. Prieto, O. Zuloaga, A. Usobiaga, N. Etxebarria, L. A. Fernández. **Use of experimental design in the optimisation of stir bar sorptive extraction followed by thermal desorption for the determination of brominated flame retardants in water samples.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 390, 739–748.
- ²⁰⁴ W. Zhang, Y. Sun, C Wu, J Xing, J. Li. **Polymer-functionalized single-walled carbon nanotubes as a novel sol-gel solid-phase microextraction coated fiber for determination of polybrominated diphenyl ethers in water samples with gas chromatography-electron capture detection.** *Anal. Chem.*, 2009, 81 (8), 2912–2920.
- ²⁰⁵ Y. Wang, J. Zhang, D. Sheng, C. Sun. **Preparation and applications of perfluorinated ion doped polyaniline based solid-phase microextraction fiber.** *J. Chromatogr. A*, 2010, 1217, 4523–4528.
- ²⁰⁶ B. Wyrzykowska, D. Tabor, B. K. Gullett. **Same-sample determination of ultratrace levels of polybromodiphenylethers, polybromodibenzo-p-dioxins/furans, and polychlorodibenzo-p-dioxins/furans from combustion flue gas.** *Anal. Chem.*, 2009, 81, 4334–4342.
- ²⁰⁷ M.-S. Wang, S.-J. Chen, K.-L. Huang, Y.-C. Lai, G.-P. Chang-Chien, J.-H. Tsai, W.-Y. Lin, K.-C. Chang, J.-T. Lee. **Determination of levels of persistent organic pollutants (PCDD/Fs, PBDD/Fs, PBDEs, PCBs, and PBBs) in atmosphere near a municipal solid waste incinerator.** *Chemosphere*, 2010, 80, 1220–1226.
- ²⁰⁸ M. A.-E. Abdallah, S. Harrad, A. Covaci. **Isotope dilution method for determination of polybrominated diphenyl ethers using liquid chromatography coupled to negative ionization atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry: Validation and application to house dust.** *Anal. Chem.*, 2009, 81, 7460–7467.
- ²⁰⁹ Z. Zhang, M. Shanmugam, S. M. Rhind. **PLE and GC-MS determination of polybrominated diphenyl ethers in soils.** *Chromatographia*, 2010, 72, 535–543.
- ²¹⁰ J. Regueiro, M. Llompart, C. García-Jares, R. Cela. **Determination of polybrominated diphenyl ethers in domestic dust by microwave-assisted solvent extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2006, 1137, 1–7.
- ²¹¹ A. M. Carro, R. A. Lorenzo, F. Fernández, R. Phan-Tan-Luu, R. Cela. **Microwave-assisted extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with mass spectrometry detection (MAE-HSSPME-GCMS/MS) for**

determination of polybrominated compounds in aquaculture samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 1021–1029.

²¹² Y. Li, T. Wang, Y. Hashi, H. Li, J.-M. Lin. **Determination of brominated flame retardants in electrical and electronic equipments with microwave-assisted extraction and gas chromatography-mass spectrometry.** *Talanta*, 2009, 78, 1429–1435.

²¹³ C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J. L. Tadeo. **Determination of polybrominated diphenyl ethers in soil by ultrasonic assisted extraction and gas chromatography mass spectrometry.** *Talanta*, 2006, 70, 1051–1056.

²¹⁴ H.-Q. Wu, X.-L. Huang, F. Huang, X.-S. Lin. **Determination of polybromodiphenyl ethers and polybromobiphenyls in electrical and electronic equipments by gas chromatography-mass spectrometry.** *Chin. J. Anal. Chem.*, 2007, 35(3), 325–329.

²¹⁵ M. Pöhlein, R. U. Bertran, M. Wolf, R. van Eldik. **Versatile and fast gas chromatographic determination of frequently used brominated flame retardants in styrenic polymers.** *J. Chromatogr. A*, 2008, 1203, 217–228.

²¹⁶ S. Mingwu, W. Chao, J. Yongjuan, D. Xinhua, F. Xiang. **Determination of selected polybrominated diphenylethers and polybrominated biphenyl in polymers by ultrasonic-assisted extraction and High-Performance Liquid Chromatography-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.** *Anal. Chem.*, 2010, 82, 5154–5159.

²¹⁷ C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J. L. Tadeo. **Analysis of polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution GC-MS.** *J. Sep. Sci.*, 2009, 32, 109–117.

²¹⁸ C. Salgado-Petinal, M. Garcia-Chao, M. Llompart, C. Garcia-Jares, R. Cela. **Headspace solid-phase microextraction gas chromatography tandem mass spectrometry for the determination of brominated flame retardants in environmental solid samples.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 385, 637–644.

²¹⁹ F. Yang, S. Jin, D. Meng, Y. Xu. **Solid phase extraction with pyrenebutyric acid-bonded silica for analysis of polychlorinated biphenyls in sewage water by gas chromatography-mass spectrometry.** *Chemosphere*, 2010, 81, 1000–1005.

²²⁰ A. C. Dirtu, L. Roosens, T. Geens, A. Gheorghe, H. Neels, A. Covaci. **Simultaneous determination of bisphenol A, triclosan, and tetrabromobisphenol A in human serum**

- using solid-phase extraction and gas chromatography-electron capture negative-ionization mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 391, 1175–1181.
- ²²¹ A. Garrido Frenich, P. Plaza Bolaños, J. L. Martínez Vidal. **Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry.** *J. Chromatogr. A*, 2007, 1153, 194–202.
- ²²² M.J. Cardador, M. Gallego. **Determination of haloacetic acids in human urine by headspace gas chromatography–mass spectrometry.** *J. Chromatogr. B*, 2010, 878, 1824–1830.
- ²²³ J. Malavia, F.J. Santos, M.T. Galceran. **Comparison of gas chromatography–ion-trap tandem mass spectrometry systems for the determination of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls.** *J. Chromatogr. A*, 2008, 1186, 302–311.
- ²²⁴ A. Schwarz, K. G. Heumann. **Two-dimensional on-line detection of brominated and iodinated volatile organic compounds by ECD and ICP-MS after GC Separation.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 374(2), 212–219.
- ²²⁵ D. Pröfrock, P. Leonhard, S. Wilbur, A. Prange. **Sensitive, simultaneous determination of P, S, Cl, Br and I containing pesticides in environmental samples by GC hyphenated with collision-cell ICP- MS.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 623–631.
- ²²⁶ A. Pereira Navaza, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel. **Absolute and accurate quantification of protein phosphorylation by using an elemental phosphorus standard and element mass spectrometry.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46(4), 569–571.
- ²²⁷ J. Giner Martínez-Sierra, F. Moreno Sanz, P. Herrero Espílez, R. Santamaria-Fernandez, J. M. Marchante Gayón, J. I. García Alonso. **Evaluation of different analytical strategies for the quantification of sulfur-containing biomolecules by HPLC-ICP-MS: Application to the characterisation of 34S-labelled yeast.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25, 989–997.
- ²²⁸ R. S. Houk. **Mass Spectrometry of Inductively Coupled Plasmas.** *Anal. Chem.*, 1986, 58(1), 97A–105A
- ²²⁹ A. Montaser, S. K. Chan, D. W. Koppenaal. **Inductively coupled helium plasma as an ion source for mass spectrometry.** *Anal. Chem.*, 1987, 59(8), 1240–1242.
- ²³⁰ B. S. Sheppard, W. L. Shen, T. M. Davidson, J. A. Caruso. **Helium-argon inductively coupled plasma for plasma source mass spectrometry.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 1990, 5(8), 697–700.

- ²³¹ C. Brede, S. Pedersen-Bjergaard. **State-of-the art of selective detection and identification of I-, Br-, Cl-, and F-containing compounds in gas chromatography and liquid chromatography.** *J. Chromatogr. A*, 2004, 1050, 45-62.
- ²³² A. P. Vonderheide, M. Montes-Bayón, J.A. Caruso. **Development and application of a method for the analysis of brominated flame retardants by fast gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection.** *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2002, 17, 1480-1485.
- ²³³ S. F. Boulyga, K. G. Heumann. **Direct determination of halogens in powdered geological and environmental samples using isotope dilution laser ablation ICP-MS.** *Int. J. Mass Spectrom.*, 2005, 242, 291-296.
- ²³⁴ K. Tagami, S. Uchida, I. Iría, H. Tsukada, H. Takeda. **Determination of chlorine, bromine and iodine in plant samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry after leaching with tetramethyl ammonium hydroxide under a mild temperature condition.** *Anal. Chim. Acta*, 2006, 570, 88-92.
- ²³⁵ M. Monperrus, E. Tessier, S. Veschambre, D. Amouroux, O. Donard. **Simultaneous speciation of mercury and butyltin compounds in natural waters and snow by propylation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 381, 854-862.
- ²³⁶ M. Üveges, L. Abrankó, P. Fodor. **Optimization of GC-ICPMS system parameters for the determination of butyltin compounds in Hungarian freshwater origin sediment and mussel samples.** *Talanta*, 2007, 73, 490-497.
- ²³⁷ D. Point, W. C. Davis, J. I. Garcia Alonso, M. Monperrus, S. J. Christopher, O. F. X. Donard, P. R. Becker, S. A. Wise. **Simultaneous determination of inorganic mercury, methylmercury, and total mercury concentrations in cryogenic fresh-frozen and freeze-dried biological reference materials.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 389, 787-798.
- ²³⁸ B. Jackson, V. Taylor, R. A. Baker, E. Miller. **Low-level mercury speciation in freshwaters by isotope dilution GC-ICP-MS.** *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43, 2463-2469
- ²³⁹ W. C. Davis, S. E. Long. **Measurements of methylmercury, ethylmercury, and inorganic mercury species in a whole blood standard reference material: SRM 955c – Toxic Elements in Caprine Blood.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, 26, 431-435.

²⁴⁰ E. Eljarrat, S. Lacorte, D. Barcelo. **Optimization of congener-specific analysis of 40 polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography/mass spectrometry.** *J. Mass Spectrom.*, 2002, 37, 76-84.

²⁴¹ J. Björklund, P. Tollbäck, C. Östman. **Mass spectrometric characteristics of decabromodiphenyl ether and the application of isotopic dilution in the electron capture negative ionization mode for the analysis of polybrominated diphenyl ethers.** *J. Mass Spectrom.*, 2003, 38, 394-400.

²⁴² L. K. Ackerman, G. R. Wilson, S. L. Simonich. **Quantitative analysis of 39 polybrominated diphenyl ethers by isotope dilution GC/low-resolution MS.** *Anal. Chem.* 2005, 77, 1979-1987.

B. OBJETIVOS

Durante mucho tiempo el hombre ha dispersado en el medioambiente todo tipo de sustancias químicas, asumiendo que la naturaleza podría asimilarlas fácilmente sin que esto tuviera ninguna repercusión ni supusiera amenaza alguna para los seres vivos y su entorno. Sin embargo, con el paso del tiempo se ha puesto de manifiesto que la capacidad reguladora de la naturaleza no es ilimitada, hasta el punto de que en la actualidad existe un grave problema de contaminación derivado de la presencia de numerosas sustancias no deseadas en el medioambiente.

Los contaminantes orgánicos halogenados se encuentran dentro del grupo de sustancias que más preocupan y a las que mayor atención se está prestando hoy en día ya que, por lo general, se caracterizan por su elevada toxicidad, persistencia y tendencia a bioacumularse y biomagnificarse. Numerosos estudios han confirmado que la exposición continuada a contaminantes orgánicos halogenados puede provocar serios problemas sobre la salud humana lo que ha obligado a tomar medidas para el control de estas sustancias. Entre estas medidas se incluyen la determinación los niveles de concentración que presentan este tipo de contaminantes en los distintos compartimentos medioambientales, la evaluación y/o revisión de su potencial toxicidad y efectos adversos sobre los seres vivos y su entorno y la regulación de los valores máximos permitidos para asegurar la conservación y protección de los ecosistemas.

El control analítico de estos contaminantes ha exigido el desarrollo de numerosos métodos analíticos que permitan llevar a cabo la determinación de estas sustancias en gran variedad de muestras. La complejidad que presentan algunas matrices objeto de análisis unida a la baja concentración a la que los analitos suelen estar presentes en algunas muestras plantea la necesidad del desarrollo de nuevas metodologías orientadas a mejorar la calidad de los resultados analíticos en términos de exactitud y precisión a la vez que resulten sencillas, rápidas y puedan implementarse con facilidad en laboratorios de rutina. En este sentido la Espectrometría de Masas ha demostrado ser una técnica muy adecuada para la determinación de contaminantes orgánicos halogenados ya que permite la identificación de los analitos de interés de forma inequívoca, proporciona una buena sensibilidad y además permite utilizar metodologías de cuantificación capaces de simplificar el proceso analítico aportando además una buena exactitud y precisión en los resultados. Sin embargo, tal como se ha mostrado en la introducción de esta Tesis aún es necesario el desarrollo de métodos

analíticos que mejoren la sensibilidad y selectividad respecto a los métodos existentes, en especial para la la cuantificación de estos compuestos en matrices complejas.

Por todo ello, el objetivo de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la determinación de contaminantes orgánicos halogenados en muestras de interés medioambiental mediante Espectrometría de Masas (MS).

Este objetivo general ha sido abordado a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo y validación de una metodología para la determinación de trihalometanos (THMs) en aguas de consumo humano mediante calibrado independiente del compuesto con patrón interno GC-(ICP)MS.
2. Síntesis de difenil éteres polibromados (PBDEs) marcados con ^{81}Br y caracterización mediante GC-(EI)MS y GC-(ICP)MS para su posterior aplicación a la determinación de PBDEs mediante análisis por dilución isotópica en muestras de interés medioambiental.
3. Desarrollo y validación de una metodología para la determinación de difenil éteres polibromados (PBDEs) prioritarios en muestras medioambientales mediante análisis por dilución isotópica GC-(EI)MS utilizando estándares marcados en ^{81}Br y deconvolución de perfiles isotópicos (IPD).
4. Desarrollo y validación de una metodología para la determinación de difenil éteres polibromados (PBDEs) prioritarios a niveles de ultratrazas en agua de río mediante análisis por dilución isotópica GC-(NCI)MS.

C. EXPERIMENTAL

C.1 INSTRUMENTACIÓN

C.1.1 GC acoplado a (ICP)QMS

La separación cromatográfica de los THMs se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases Varian 3400 (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) con un inyector con/sin división de flujo y una columna capilar de baja polaridad, especial para la separación de volátiles modelo DB-VRX de 60 m de longitud x 0,32 mm de diámetro interno x 1,8 µm de espesor de la fase estacionaria (J&W Scientific, Folsom, CA, USA). Como detector se utilizó un espectrómetro de masas (MS) con una fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y un analizador de tipo cuadrupolo (Q). La *Figura 11* muestra la configuración instrumental utilizada.



Figura 11. Sistema GC-(ICP)QMS

El (ICP)QMS es el modelo HP-4500 de Hewlett Packard (Yokogawa Analytical Systems Inc., Tokio, Japón) equipado, en su versión convencional, con una bomba peristáltica y un nebulizador concéntrico (tipo Meinhard), una cámara de nebulización de doble paso (tipo Scott) refrigerada por efecto Peltier a una temperatura constante de 2°C. La antorcha (tipo Fassel) se compone de tres tubos concéntricos de cuarzo, el central para el flujo de Ar portador (o nebulizador) de 1.5 mm de diámetro, el intermedio para el Ar auxiliar y el exterior para el Ar refrigerante. La interfase está constituida por los conos de extracción (*sampler*) y de muestreo (*skimmer*). Ambos conos son de níquel y tienen

un diámetro de 1 mm y 0.4 mm respectivamente. El detector es un multiplicador de electrones secundarios (SEM) que funciona tanto en modo digital como analógico dependiendo de la intensidad de las señales. En la *Figura 12* se muestra el esquema del (ICP)QMS.

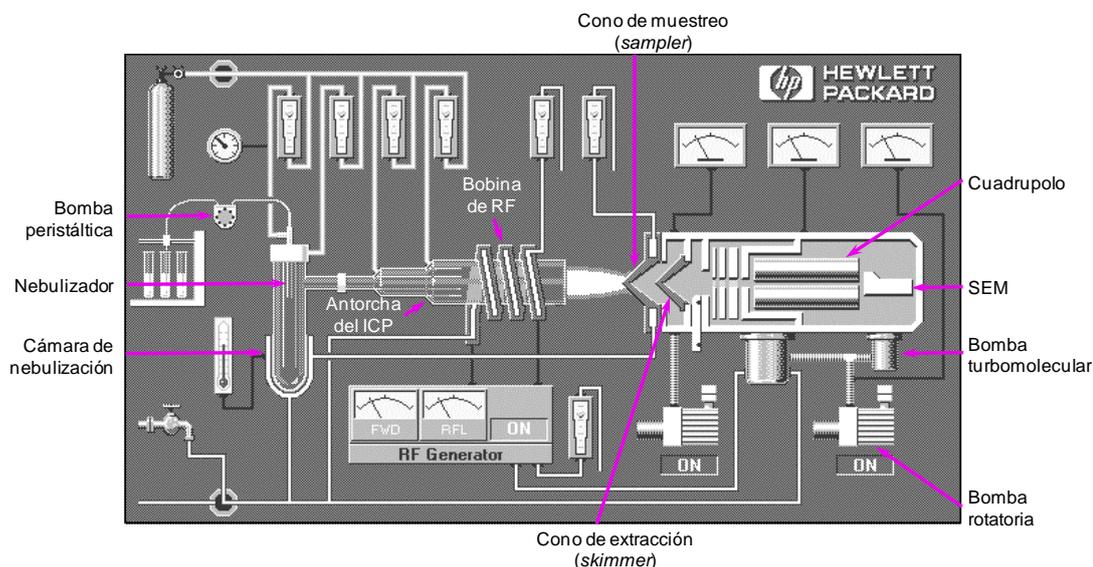


Figura 12. Esquema del equipo (ICP)QMS (HP-4500, Agilent)

La señal del (ICP)MS en su modo de trabajo convencional (introducción de muestras líquidas nebulizadas) fue optimizada diariamente con un patrón de 10 ng · g⁻¹ de Li, Y y Tl en ácido nítrico al 1% (p/p) con objeto de seguir un plan de control de calidad del equipo.

El acoplamiento entre el GC y el (ICP)MS se realizó a través de una interfase de transferencia diseñada previamente en nuestro grupo de investigación.^{1,2} Como características más importantes cabe destacar su gran sencillez, bajo coste y facilidad de acoplamiento, que únicamente requiere el desplazamiento de la cámara de nebulización hacia atrás sin necesidad de realizar ningún tipo de modificación en el (ICP)MS. Esta interfase consiste en un tubo de acero inoxidable donde se introduce el final de la columna cromatográfica capilar. Dicho tubo atraviesa longitudinalmente un bloque metálico que posee un sensor de temperatura y un calentador conectados a un termostato externo. El tubo metálico está conectado en su parte superior a una pieza en forma de "T" que permite la introducción de un flujo envolvente de gas auxiliar que facilita el arrastre de los analitos que salen separados de la columna hacia la fuente del MS. La salida superior de la pieza se conecta directamente a la antorcha del (ICP)MS

mediante un tubo flexible de PFA que se introduce parcialmente dentro de su canal central. Todo este sistema va introducido dentro de una carcasa metálica rellena con lana de vidrio que ayuda a mantener estable la temperatura de la interfase. La *Figura 13* muestra la interfase utilizada para realizar el acoplamiento GC-(ICP)QMS.

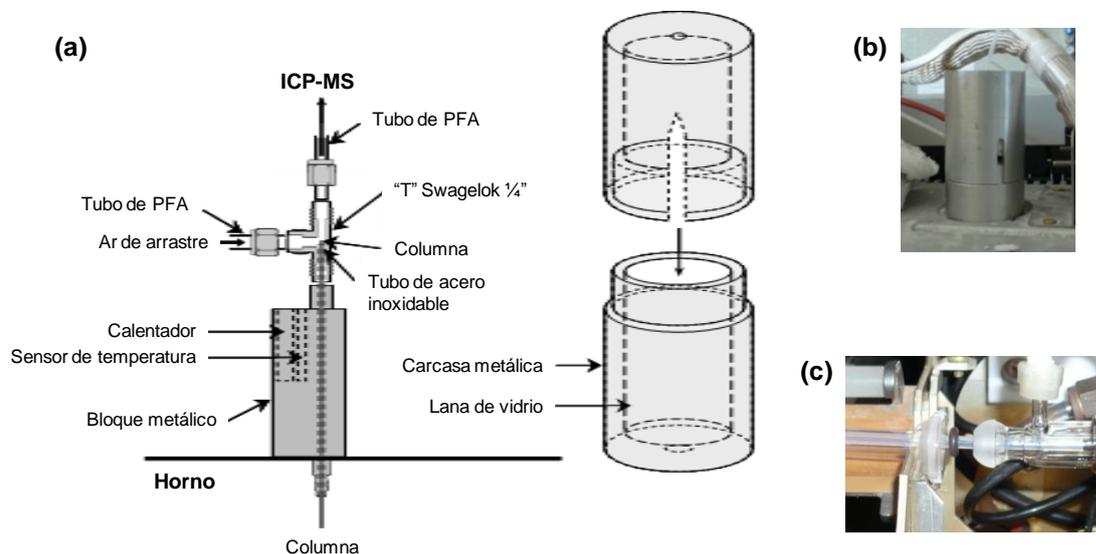


Figura 13. *Interfase utilizada para el acoplamiento GC-(ICP)MS*

- (a) *Esquema de la interfase, (b) Interfase colocada a la salida del cromatógrafo de gases, (c) Detalle del acoplamiento del tubo de PFA a la antorcha del (ICP)MS*

Las condiciones de trabajo del sistema GC-(ICP)MS (potencial de las lentes) fueron optimizadas diariamente a través de los iones de $m/z = 76$ y 78 correspondientes a los dímeros de Ar ($^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ y $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$).

El modelo de interfase mostrado en la *Figura 13* es una evolución de la desarrollada previamente ya que se minimiza su tamaño y se mejoran sus prestaciones. La principal ventaja de esta interfase frente a las interfases comerciales es que no es necesario calentar el tubo inerte de PFA debido a que el flujo envolvente de argón introducido transporta casi instantáneamente a los analitos desde el cromatógrafo hasta el plasma, impidiendo su condensación. Se han publicado algunos trabajos en los que se demuestra que, excepto para especies de altos pesos moleculares, las anchuras de pico se mantienen con respecto a las obtenidas con el detector de ionización de llama (FID).³

C.1.2 GC acoplado a (ICP)QMS con celda de colisión/reacción

Para la caracterización de los PBDEs marcados isotópicamente en ^{81}Br se utilizó un sistema GC-(ICP)MS diferente al descrito en la sección C.1.1. En este caso la separación cromatográfica se llevó a cabo mediante un GC modelo 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) con un inyector con/sin división de flujo y una columna capilar de baja polaridad modelo TRB 5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (Teknokroma, Barcelona, España). Como detector se utilizó un espectrómetro de masas (MS) con una fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y un analizador de tipo cuadrupolo (Q). La *Figura 14* muestra la configuración instrumental utilizada.



Figura 14. Sistema GC-(ICP)QMS con celda de colisión/reacción

El (ICP)QMS es el modelo 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón), que se diferencia fundamentalmente del descrito en la sección C.1.1 en que consta de un sistema de octapolo de reacción (ORS) que permite minimizar las interferencias poliatómicas que pueden interferir en la medida de algunos elementos mediante (ICP)MS. La celda del octapolo está situada entre el sistema de lentes y el analizador y puede ser presurizada con He, H₂ o mezclas de ambos para funcionar como celda de colisión y/o reacción. Los gases se introducen en la celda utilizando un controlador de flujo másico a través de una línea de acero. Cuando no se presuriza la celda con ningún gas ésta funciona simplemente como guía de iones transmitiéndolos desde la zona donde se encuentran las lentes hacia el analizador de masas. Además este equipo consta de una placa de platino denominada “*shield torch*”, que se conecta a tierra y se inserta entre la bobina que aplica las radiofrecuencias y la antorcha para eliminar el

acoplamiento capacitivo que se produce entre el plasma y la bobina de radiofrecuencias. En la *Figura 15* se muestra un esquema de este instrumento.

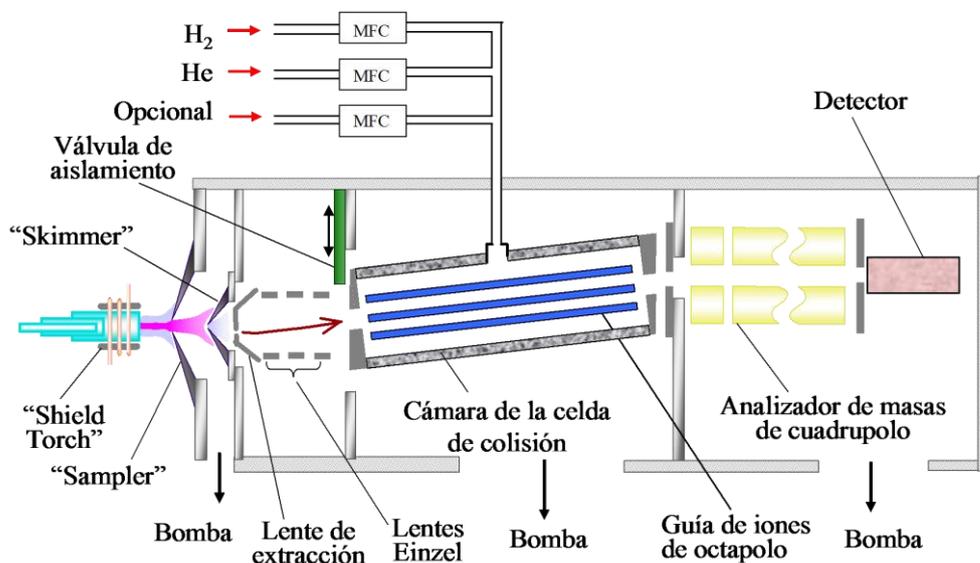


Figura 15. Esquema del equipo (ICP)QMS con celda de colisión/reacción (Agilent 7500ec)

El acoplamiento entre el GC y el (ICP)MS se realizó a través de la misma interfase de transferencia que ha sido descrita en la sección C.1.1. Las condiciones de trabajo tanto del (ICP)MS en su modo de trabajo convencional como acoplado a GC fueron optimizadas diariamente del mismo modo que se ha explicado en la sección C.1.1.

C.1.3 GC-MS

La caracterización de los PBDEs marcados isotópicamente en ^{81}Br así como la determinación de los PBDEs prioritarios en muestras de interés medioambiental se llevó a cabo mediante GC-MS. Para ello se utilizaron los instrumentos que se muestran en la *Figura 16*.



(a) *Agilent Technologies*



(b) *Shimadzu*

Figura 16. GC-MS

El primero de los instrumentos utilizados consta de un GC modelo 6890N (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con un inyector con/sin división de flujo y un automuestreador modelo 7683 (Agilent). Como detector tiene un MS con analizador de tipo cuadrupolo modelo 5975B (Agilent Technologies, Tokio, Japón).

El otro instrumento es un GC-MS modelo QP2010 Plus (Shimadzu, Kioto, Japón) equipado con un inyector con/sin división de flujo y un automuestreador modelo AOC-5000 (Shimadzu). El detector es un MS con analizador de tipo cuadrupolo.

Ambos equipos disponen de dos fuentes de ionización, EI y NCI intercambiables según las necesidades de trabajo.

La calibración de ambos equipos se llevó a cabo usando como patrón PFTBA, que es una sustancia que al presentar sus picos más intensos a las masas 69, 219 y 502 permite el ajuste de los parámetros relativos a la calibración de masas, la extracción, enfoque, aceleración y detección de los iones en un amplio intervalo de masas. De esta forma se optimizan los parámetros electrónicos (potencial de las lentes, voltaje del detector) de modo que permitan obtener la mejor forma de pico, la mayor sensibilidad de los mismos y una buena resolución de sus masas.

Para la separación cromatográfica se utilizaron tres columnas capilares de baja polaridad que poseen fases estacionarias muy similares entre sí, por lo que se consideran equivalentes. Estas columnas fueron una HP-5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA), una DB-5MS UI (ultra inerte) de 30 m x 0,25

mm x 0,25 µm (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) y una SGE BPX5 de 50 m x 0,25 mm x 0,25 µm (SGE Analytical Science, Bester, Amstelveen, The Netherlands).

C.1.4 HPLC-DAD

La purificación de los PBDEs marcados isotópicamente en ⁸¹Br se llevó a cabo mediante LC. Para ello se utilizó un HPLC modelo 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). Este sistema consta de un desgasificador en línea de cuatro canales, una bomba binaria, un automuestreador con bandeja para las muestras, un compartimento termostatzado para la columna cromatográfica y un detector visible-ultravioleta (190-700 nm) de diodos en serie (DAD). La columna empleada para la separación fue una C18 de fase reversa modelo Zorbax Eclipse XDB-C18 de 4,6 mm x 15 mm con 5 µm de tamaño de partícula de relleno (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

C.1.5 Otra instrumentación

Las pesadas se realizaron en una balanza analítica de 0,1 mg de precisión modelo AB204-S (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Suiza).

Las extracciones líquido-líquido se llevaron a cabo mediante un agitador mecánico modelo Reax 2 (Heidolph, Kelheim, Alemania).

En la síntesis de compuestos marcados isotópicamente se utilizó una placa calefactora con agitador magnético modelo RTC Basic y con controlador de temperatura modelo ETS-D5 (IKA-Werke, Staufen, Alemania). Para la agitación se emplearon barras magnéticas desechables recubiertas de PTFE.

Para la eliminación de disolventes y preconcentración de las muestras se utilizó un sistema de evaporación/preconcentración de seis puertos modelo Mini-Vap (Supelco Analytical, Bellefonte, PA, USA).

Para la eliminación del disolvente tras la etapa de síntesis se utilizó un rotavapor modelo WB 2000/VV 2000 (Heidolph, Kelheim, Alemania).

Para el acondicionamiento de la sílice y el sulfato de sodio anhidro utilizados como relleno de las columnas se empleó una mufla que alcanza una temperatura máxima de 1000 °C modelo 10-PR/200 Serie 74 (Herón, Barcelona, España).

Para romper las emulsiones formadas en la etapa de LLE en muestras reales de agua se utilizó una centrífuga modelo Centromix (J. P. Selecta, Barcelona, España).

Para el secado de todo el material de vidrio se empleó una estufa modelo UNB 300 (Mettler, GmbH+COKG, Büchenbach, Alemania)

C.2 MATERIALES Y REACTIVOS

C.2.1 Patrones, disolventes y material de vidrio

Para la preparación de disoluciones patrón de THMs se utilizó metil-*tert*-butiléter (MTBE) y como disolvente de extracción pentano suministrados ambos por Fluka (Buchs SG, Suiza). Estos disolventes son de grado reactivo y tienen una pureza $\geq 99,0\%$. Como patrón se utilizó una mezcla comercial de THMs con una concentración de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada componente en metanol suministrado por Supelco (Bellefonte, PA, USA) y como patrón interno CBrCl_3 con una pureza del 99% de Aldrich (Steinheim, Alemania). Las disoluciones patrón intermedias se prepararon gravimétricamente por dilución de la mezcla de THMs en MTBE y se almacenaron en la oscuridad a -18°C . Las disoluciones diluidas se prepararon diariamente por dilución de las anteriores en pentano.

Para la síntesis de PBDEs marcados isotópicamente en ^{81}Br se utilizó bromuro de sodio enriquecido en ^{81}Br ($99,62\%$) suministrado por Trace International Sciences Corp. (Richmond Hill, ON, Canadá). Para la optimización de la reacción de síntesis se empleó bromuro de sodio de abundancia natural con una pureza de $99,995\%$ suministrado por Fluka. En la síntesis también se utilizó difenil éter de Fluka con un $99,9\%$ de pureza, Oxone® (peroxomonosulfato de potasio) de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), cloruro de aluminio anhidro y diclorometano de Fluka y sulfato de sodio anhidro de Merck (Darmstadt, Alemania).

Para la puesta a punto y el desarrollo de métodos para la determinación de PBDEs en distintos tipos de muestras de interés medioambiental se utilizaron patrones individuales de siete congéneres (28, 47, 99, 100, 153, 154 y 183) en nonano con una concentración certificada de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estos patrones así como un congénere tetrabromado marcado isotópicamente en ^{13}C ($^{13}\text{C}_{12}$ -BDE47) con una concentración certificada de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en nonano y una pureza isotópica del 99% , fueron

suministrados por Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, USA). Las disoluciones de trabajo de los patrones marcados y no marcados fueron preparadas gravimétricamente en isooctano y almacenadas en la oscuridad a 4 °C hasta su uso. Otros disolventes utilizados en las etapas de purificación de los congéneres marcados isotópicamente en ^{81}Br o de preparación de muestra fueron acetona, metanol y hexano suministrados por Fluka (Steinheim, Alemania) y diclorometano y dietil éter de Sigma-Aldrich. Todos los disolventes utilizados fueron de alta pureza. Otros reactivos utilizados para la preparación de muestras fueron sulfato de sodio anhidro y gel de sílice para cromatografía en columna (0,063-0,200 mm) ambos de Merck.

Para la toma de muestras de agua de consumo humano y aguas de río se utilizaron botellas de color ámbar de 500 mL con tapones de rosca GL recubiertos de PTFE. Para la preparación de los patrones y en la reacción de síntesis se utilizaron viales de vidrio de color ámbar con tapón fenólico recubierto de PTFE. Las extracciones líquido-líquido en las muestras de aguas de consumo humano se llevó a cabo en matraces aforados de 100 mL con tapones de vidrio esmerilado. En el caso de las aguas de río se utilizaron embudos de extracción para la LLE.

Para la extracción de las muestras sólidas se utilizaron equipos de Soxhlet con cuerpos de extracción para un volumen máximo de 250 mL (Pobel, Madrid, España) sobre un baño de Kuderna Danish modelo Precistern (J. P. Selecta, Barcelona, España) que también se utilizó para la evaporación del disolvente y preconcentración de los extractos.

En la etapa de limpieza se utilizaron columnas de vidrio para cromatografía con placa porosa soldada n^o (120-200 μm) de 400 mm x 20 mm i.d. con un volumen aproximado de relleno de 120 mL (Pobel, Madrid, España) y para el fraccionamiento se utilizaron columnas fabricadas a medida con unas dimensiones de 120 mm x 10 mm i.d. y un depósito en la parte superior de 30 mm x 50 mm i.d.

Todo el material de vidrio utilizado en la toma y preparación de muestra fue lavado con detergente (Mucasol de Brand GmbH+COKG, Wertheim, Alemania), aclarado con agua ultrapura y secado en estufa a 80 °C durante al menos una hora. Previamente a su uso se dejó enfriar, se aclaró con el disolvente de trabajo y se dejó secar a temperatura ambiente.

El agua ultrapura fue obtenida de un sistema de purificación de agua modelo Milli-Q Gradient A10 (Millipore S.A.S, Molsheim, Francia).

C.2.2 Muestras y materiales de referencia

Las muestras de agua de consumo humano (500 mL) se recogieron en domicilios particulares situados en distintos puntos de la red de abastecimiento de agua potable de Asturias (España). En la *Figura 17* se puede ver la situación de los puntos de muestreo. Para la toma de muestra se dejó correr el agua del grifo durante al menos diez minutos y a continuación, tras homogeneizar el recipiente con la muestra, se rellenó lentamente reduciendo al mínimo el caudal de agua y entornando el recipiente para evitar perturbaciones que puedan provocar la pérdida de las sustancias volátiles por desgasificación de la muestra. La botella se rellenó hasta arriba evitando que quedara espacio de cabeza y se tapó inmediatamente. Las muestras se conservaron boca abajo y a 4 °C, evitando su calentamiento durante el transporte de las mismas. En todos los casos las muestras fueron tratadas dentro de las 24 horas siguientes al momento de la toma de muestra y analizadas en menos de 48 horas.

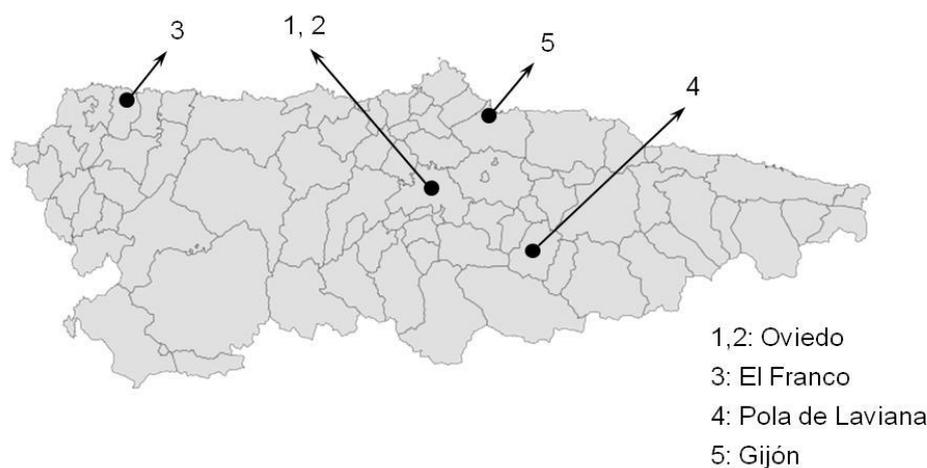


Figura 17. Puntos de toma de muestra para la determinación de THMs en aguas potables

Las muestras de agua de río fueron tomadas en el mes de julio de 2010 a lo largo del río Nalón, que fue seleccionado para este trabajo por ser el río más largo y más importante de Asturias (España), con una cuenca hidrográfica de 4830 km² que supone el 46 % del territorio de la región. En la *Figura 18* se muestran los puntos seleccionados para el muestreo.

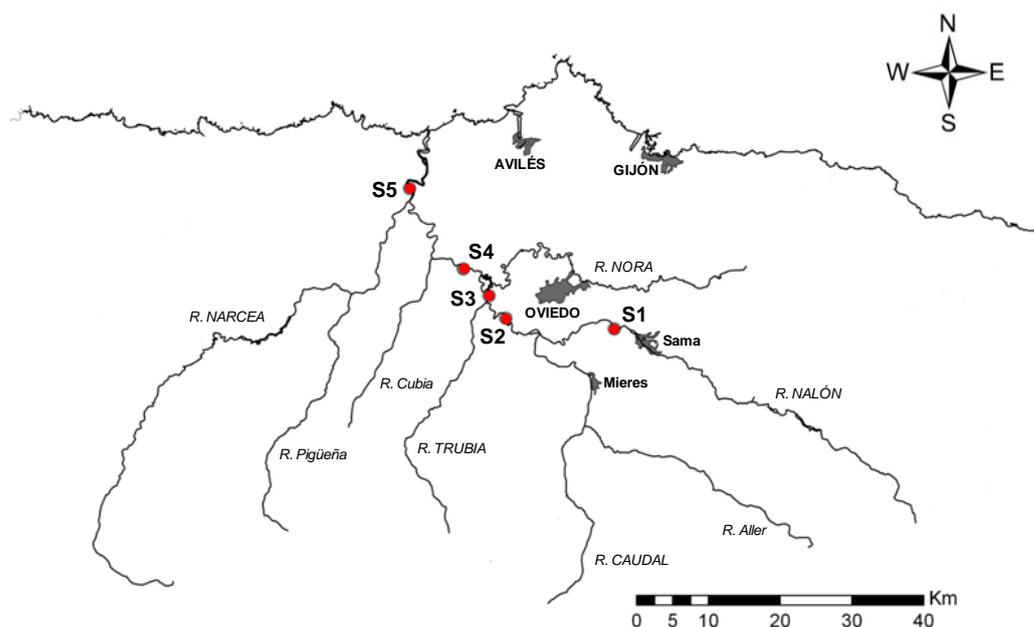


Figura 18. *Puntos de toma de muestra para la determinación de PBDEs en agua de río*

Como se puede observar el primero de los puntos de muestreo fue el más cercano al nacimiento del río, antes de su confluencia con sus principales afluentes. El resto de las muestras fueron recogidas río abajo después de la desembocadura de cada uno de sus principales afluentes (ríos Caudal, Trubia, Nora y Narcea) que pasan por algunas de las zonas urbanas más importantes de la región. Los recipientes de toma de muestra, previamente pesados, fueron homogeneizados y después rellenos con agua de río hasta un volumen aproximado de 500 mL.

Todos los materiales de referencia certificados analizados en este trabajo fueron proporcionados por el Instituto Nacional de Normas y Tecnología (NIST).

En la parte dedicada a la determinación de THMs en aguas de consumo humano se analizó el material de referencia certificado NIST SRM 1639 que contiene algunos HVOCs en metanol a distintos niveles de concentración, cuyo uso está orientado a la calibración de la instrumentación cromatográfica y el estudio de recuperaciones en la determinación de estas sustancias en agua. Para su correcta conservación este material de referencia fue almacenado en la oscuridad a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. La *Tabla 26* muestra los valores de concentración certificados para los THMs en este material de referencia.

Tabla 26. Valores certificados para los THMs en el material de referencia SRM 1639

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*
Cloroformo	6235 \pm 340
Clorodibromometano	124,6 \pm 1,1
Bromodiclorometano	389,9 \pm 7,1
Bromoformo	86,5 \pm 1,4

* Incertidumbre estimada para medidas realizadas por GC con un nivel de confianza mínimo de 95 %

En la parte dedicada a los PBDEs se utilizaron dos materiales de referencia certificados. El primero de ellos fue el NIST SRM 2257, que consiste en una mezcla de 38 congéneres en isooctano y cuyo uso está orientado a la calibración de sistemas cromatográficos para la determinación de estos compuestos. Para su correcta conservación este material de referencia fue almacenado en la oscuridad a 4 °C. La *Tabla 27* muestra los valores de concentración certificados para los PBDEs de interés en este material de referencia.

Tabla 27. Valores certificados para los PBDEs en el material de referencia SRM 2257

Compuesto ^a	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^b
PBDE 28 (2,4,4'-tribromodifenil éter)	1,88 \pm 0,14
PBDE 47 (2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter)	2,09 \pm 0,16
PBDE 49 (2,2',4,5'-tetrabromodifenil éter)	3,95 \pm 0,31
PBDE 99 (2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter)	2,127 \pm 0,090
PBDE 100 (2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter)	3,05 \pm 0,15
PBDE 153 (2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter)	2,048 \pm 0,068
PBDE 154 (2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter)	1,622 \pm 0,057

^a Cuando dos congéneres coeluyen en las condiciones de separación empleadas los resultados cuantitativos se basan en la respuesta de ambos congéneres.

^b Los resultados se expresan como el valor certificado \pm la incertidumbre expandida. El valor certificado es el promedio de concentraciones obtenidas en medidas gravimétricas y cromatográficas corregidas por la pureza. La incertidumbre expandida (nivel de confianza de 95 %) con un factor de cobertura $k = 2$.

El otro material de referencia es el NIST SRM 1947 y es un tejido de pescado del lago Michigan destinado a la evaluación de métodos analíticos para la determinación de ciertos PBDEs, entre otras sustancias, en este tipo de matriz u otras similares. Este material de referencia proporciona valores certificados para la concentración de siete PBDEs y valores de referencia para otros tres congéneres. Para su correcta conservación este material de referencia fue almacenado en la oscuridad a -80 °C. La *Tabla 28* muestra los valores de concentración certificados para los PBDEs de interés en este material de referencia.

Tabla 28. Valores certificados para los PBDEs en el material de referencia SRM 1947

Compuesto ^a	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^b
PBDE 28 (2,4,4'-tribromodifenil éter)	
33 (2',3,4-tribromodifenil éter)	$2,26 \pm 0,46^c$
PBDE 47 (2,2',4,4'-tetrabromodifenil éter)	$73,3 \pm 2,9$
PBDE 49 (2,2',4,5'-tetrabromodifenil éter)	$4,01 \pm 0,10$
PBDE 99 (2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter)	$19,2 \pm 0,8$
PBDE 100 (2,2',4,4',6-pentabromodifenil éter)	$17,1 \pm 0,6$
PBDE 153 (2,2',4,4',5,5'-hexabromodifenil éter)	$3,83 \pm 0,04$
PBDE 154 (2,2',4,4',5,6'-hexabromodifenil éter)	$6,88 \pm 0,52$

^a Cuando dos congéneres coeluyen en las condiciones de separación empleadas los resultados cuantitativos se basan en la respuesta de ambos congéneres.

^b Los resultados se expresan (en peso húmedo) como el valor certificado \pm la incertidumbre expandida. El valor certificado es el promedio de concentraciones obtenidas mediante tres o cuatro métodos analíticos. La incertidumbre expandida (nivel de confianza de 95 %) con un factor de cobertura $k = 2$ calculada siguiendo la norma *ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*.

^c Valores de referencia

C.3 PROCEDIMIENTOS

C.3.1 Procedimientos experimentales

C.3.1.1 Determinación de THMs en aguas de consumo humano

Para la determinación de THMs en agua de consumo humano se midieron exactamente 100 mL de muestra en matraces aforados con tapones de vidrio esmerilado. A continuación se añadió una cantidad adecuada de patrón interno y 4 mL de pentano como disolvente de extracción. Todos los volúmenes fueron controlados gravimétricamente con el fin de corregir los posibles errores en la medida de volúmenes. El recipiente se agitó mecánicamente durante diez minutos. A continuación la mezcla se dejó reposar unos minutos para que se separaran las dos fases. Posteriormente se recogió el extracto orgánico y se inyectó manualmente 1 μL en el sistema GC-(ICP)MS para la determinación de THMs. En todos los casos se midieron las relaciones $m/z = 35$ y 37 para el Cl y $m/z = 79$ y 81 para el Br. Las concentraciones de los THMs en la muestra fueron obtenidas a través de la metodología del calibrado independiente del compuesto (CIC) con patrón interno, que será descrita, junto con las condiciones experimentales de trabajo, en la sección C.3.2.1.

Para el estudio de las características analíticas del método se utilizaron muestras de agua procedente de la red de abastecimiento público o muestras de agua ultrapura fortificadas con el patrón de THMs o con el material de referencia certificado NIST SRM 1636 las cuales se trataron del mismo modo que las muestras reales de agua de consumo humano.

C.3.1.2 Síntesis de PBDEs marcados isotópicamente en ^{81}Br

La síntesis de patrones de PBDEs marcados isotópicamente consta de dos etapas. La primera de ellas es una reacción de oxidación en la que el Br^- se transforma en Br_2 y la segunda es una sustitución electrófila aromática en la que uno de los átomos del Br_2 aumenta su electrofilicidad con ayuda de un catalizador (ácido de Lewis) para poder incorporarse al anillo aromático.

Para la primera etapa se pesaron en un vial ámbar de 7 mL unos 55 mg de bromuro de sodio enriquecido en ^{81}Br y se disolvieron en 1 mL de agua. Sobre esta disolución se añadió aproximadamente 1 mL de diclorometano. La mezcla se agitó mediante un sistema de agitación magnética. Sin detener la agitación se añadieron lentamente unos 340 mg de Oxone® y se tapó el vial para dejar que transcurriera la reacción. Tras un periodo de 15 minutos se completó la reacción de oxidación. El $^{81}\text{Br}_2$ generado, que pasó a la fase orgánica, se separó y se hizo pasar por una pequeña columna cromatográfica rellena con sulfato de sodio anhidro (100 °C) para filtrar y secar el extracto orgánico. Para llevar a cabo la etapa de sustitución electrófila aromática se añadieron 50 mg de cloruro de aluminio anhidro (como catalizador) y 0,7 mg de difenil éter sobre la fase orgánica que contenía el $^{81}\text{Br}_2$. La mezcla se agitó (agitación magnética) a 40 °C durante 6 horas. Una vez completada la reacción se dejó que la mezcla se enfriara hasta alcanzar la temperatura ambiental y a continuación se lavó la disolución de reacción con tres porciones de 1 mL de agua ultrapura para eliminar el catalizador de la reacción y otras impurezas de naturaleza inorgánica que hubieran podido formarse en esta segunda etapa. De nuevo la disolución orgánica obtenida se filtró y secó con sulfato de sodio anhidro y se evaporó a presión reducida para eliminar el disolvente y otros posibles subproductos volátiles de la reacción. Por último, el residuo seco se redisolvió en diclorometano, obteniéndose así el denominado crudo de reacción. La *Figura 19* muestra un esquema del procedimiento seguido para la síntesis de estos compuestos.

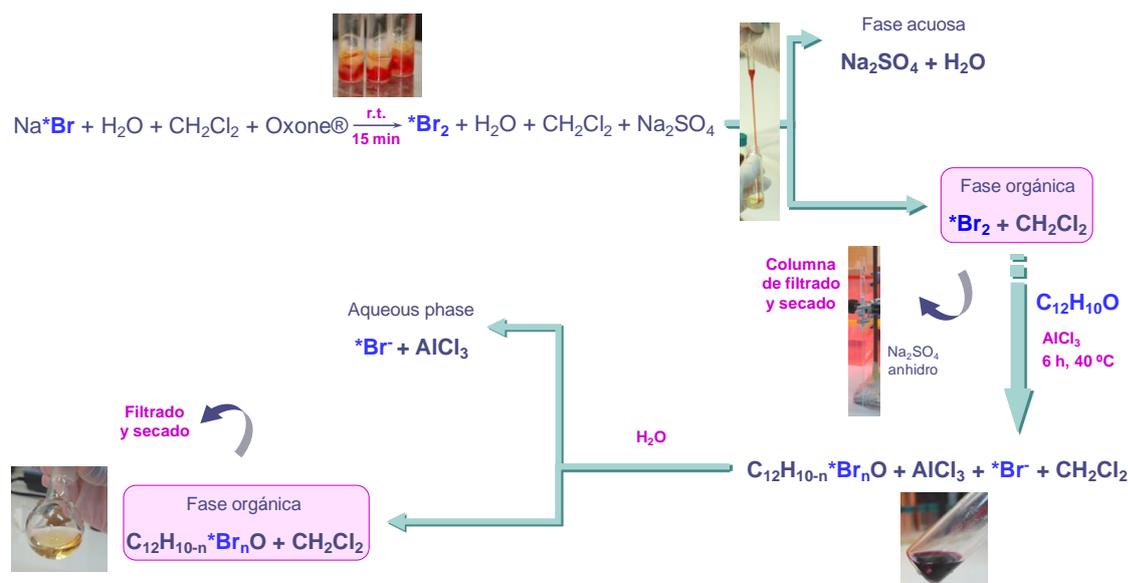


Figura 19. Esquema de síntesis para la obtención de patrones de PBDEs marcados isotópicamente en ^{81}Br

C.3.1.3 Purificación de PBDEs marcados isotópicamente en ^{81}Br

Para la separación de cada uno de los congéneres presentes en el producto crudo de la reacción de síntesis de PBDEs se eliminó por evaporación el disolvente original (diclorometano) y el residuo seco se redisolvió en acetona. La separación de los distintos congéneres presentes en el crudo de reacción se llevó a cabo mediante HPLC, utilizando una columna C18 y trabajando en modo isocrático. La fase móvil fue una mezcla de metanol (92 %) y agua (8%), preparada diariamente y desgasificada durante 15 minutos con helio para eliminar el oxígeno disuelto. La columna se equilibró diariamente pasándole un flujo de 1 mL min^{-1} de la fase móvil hasta obtener una señal de fondo constante. También se inyectó diariamente un patrón natural de PBDEs que contenía los congéneres presentes en crudo de reacción con el fin de obtener los tiempos de retención de cada uno de los congéneres de interés. Para la purificación de los patrones marcados se inyectaron alícuotas de $20 \mu\text{L}$ del crudo de reacción disuelto en acetona y para cada inyección se recogieron seis fracciones a los tiempos de retención correspondientes a la elución de los congéneres 28, 47, 99, 100, 153 y 154. Cada fracción recogida se evaporó en corriente de nitrógeno y se redisolvió en isooctano. El proceso de separación de los PBDEs marcados isotópicamente se repitió tantas veces como fue necesario hasta conseguir una cantidad de patrón adecuada para poder ser utilizado en trabajos futuros. Finalmente se juntaron todas las fracciones que

contenían el mismo congénere marcado y la disolución resultante se preconcentró hasta un volumen final de 1 mL aproximadamente. Adicionalmente se inyectaron 2 μ L de cada una de ellas en un GC-(EI)MS para comprobar la pureza de las fracciones obtenidas.

C.3.1.4 Caracterización del patrón de PBDEs marcados en ^{81}Br

Los patrones marcados isotópicamente se caracterizaron tanto en abundancias isotópicas como en concentración mediante la técnica de GC-MS, utilizando para ello tres fuentes de ionización diferentes (ICP, EI y ECNI).

La caracterización en abundancias isotópicas se llevó a cabo inyectando el patrón marcado isotópicamente en cada uno de los sistemas de GC-MS. Para las fuentes de ICP y ECNI, que proporcionan las señales correspondientes a los dos isótopos de Br ionizados bien positivamente (ICP) o negativamente (ECNI), la abundancia isotópica de cada congénere se obtuvo directamente midiendo la señal para $m/z = 79$ y 81 e integrando el área bajo la curva a los tiempos de retención correspondientes para cada congénere. En el caso de la fuente de EI los iones de $m/z = 79$ y 81 no proporcionan señales lo suficientemente intensas para poder caracterizar el patrón en abundancias, por lo que fue necesario recurrir a los iones presentes en el clúster correspondiente al ion molecular (M^+). Puesto que estos iones contienen otros átomos además de Br, fue necesario calcular las abundancias isotópicas de Br mediante métodos matemáticos basados en un procedimiento de mínimos cuadrados múltiples que será descrito con más detalle en la sección C.3.2.2.2.

La caracterización en concentraciones de los patrones marcados se llevó a cabo por dilución isotópica inversa inyectando una mezcla del patrón marcado isotópicamente con un patrón natural de concentración conocida o certificada para cada uno de los congéneres de interés (28, 47, 49, 99, 100, 153 y 154). Cuando la caracterización se realizó en sistemas en los que se mide la señal correspondiente a los iones de los dos isótopos de Br (ICP y NCI) las concentraciones se obtuvieron a través de la ecuación de la dilución isotópica elemental, mientras que en aquellos casos en los que se midieron otros iones que contienen otros elementos además de Br las concentraciones se obtuvieron por deconvolución de perfiles isotópicos. Ambos procedimientos matemáticos se describirán con más detalle en la sección C.3.2.2.

En todas las medidas en la que se monitorizó la señal de los iones de los dos isótopos de Br (ICP y NCI) se utilizó un patrón natural de PBDEs para detectar la posible discriminación de masas del sistema y corregirla en el caso de que fuera necesario. De manera análoga cuando la caracterización se llevó a cabo mediante la monitorización de otros iones (EI) se inyectó periódicamente un patrón natural de PBDEs para controlar las posibles variaciones en el patrón de fragmentación y corregirlas en los casos en los que esto fuera necesario. Las condiciones experimentales de trabajo se muestran también en la sección C.3.2.2.

C.3.1.5 Determinación de PBDEs en muestras de pescado (SRM 1947 Lake Michigan fish tissue)

El material de referencia utilizado para validar la metodología desarrollada para la determinación de PBDEs en material biológico es un homogeneizado obtenido a partir de filetes de trucha (*Salvelinus namaycush*). Para la preparación de la muestra se tomaron submuestras de 1 g que se mezclaron en un mortero con sulfato de sodio anhidro hasta obtener una mezcla homogénea. La mezcla se dejó reposar durante unas tres horas para el secado completo de las muestras (obtención de un polvo suelto) y a continuación se introdujo en un cartucho de Soxhlet para llevar a cabo la extracción de los analitos presentes en la matriz de la muestra. Tras añadir una cantidad conocida del patrón de PBDEs marcados en ^{81}Br a tres niveles de concentración diferentes (*Tabla 29*) sobre cada una de las muestras, se llevó a cabo la extracción Soxhlet durante 12 h utilizando como extractante una mezcla de hexano y acetona (3:1, v/v). A continuación se preconcentraron los extractos obtenidos mediante un sistema de evaporación Kuderna-Danish y se cambió el disolvente a isooctano hasta obtener un extracto final de 1-2 mL.

Tabla 29. Concentración de ^{81}Br -PBDEs añadida a las muestras de SRM 1947*

Congénere	Concentración de ^{81}Br -PBDEs (ng g ⁻¹)		
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
BDE-28	8,42	16,67	30,70
BDE-47	40,98	81,16	149,45
BDE-49	0,71	1,40	2,58
BDE-99	7,14	14,16	26,07
BDE-100	3,87	7,68	14,13
BDE-153	7,95	15,75	29,00
BDE-154	0,54	1,09	2,00

*Concentraciones calculadas para un peso de muestra de 1 g

La siguiente etapa en la preparación de muestra fue la limpieza de los extractos. Para ello se prepararon columnas cromatográficas de vidrio rellenas con 20 g de gel de sílice impregnada con ácido sulfúrico (40% H_2SO_4). Sobre esta columna se añadieron los extractos preconcentrados obtenidos en la etapa anterior y se eluyeron con una mezcla de diclorometano y hexano (3:7, v/v). De nuevo los extractos se preconcentraron en un sistema Kuderna Danish y tras cambiar el disolvente a isooctano se redujeron hasta un volumen final de 1 mL bajo corriente de nitrógeno.

Posteriormente, los extractos obtenidos en la etapa de limpieza fueron sometidos a una etapa de fraccionamiento, para la que se emplearon columnas de vidrio rellenas con 1,8 g de gel de sílice impregnada con agua ultrapura (1,5% H_2O). Los extractos obtenidos en la etapa de limpieza se añadieron sobre la columna y se eluyeron en tres fracciones, la primera de ellas en hexano, la segunda con una mezcla de hexano y dietil éter (85:15, v/v) y la tercera en dietil éter. La calibración de las columnas de fraccionamiento se llevó a cabo con el material de referencia SRM 2257. Bajo las condiciones experimentales concretas empleadas en este trabajo todos los PBDEs eluyen en las dos primeras fracciones las cuales se combinaron y se evaporaron hasta un volumen final de unos pocos microlitros tras cambiar el disolvente a isooctano.

Estos extractos se almacenaron en la oscuridad a 4 °C hasta su inyección en los distintos sistemas de GC-MS. Las concentraciones de los PBDEs en la muestra se obtuvieron a través de las ecuaciones del análisis por dilución isotópica (IDA), bien en

su modo elemental o molecular dependiendo de la fuente utilizada y del tipo de iones generados en la misma. Estas metodologías de cuantificación serán comentadas en la sección C.3.2.2.

C.3.1.6 Determinación de PBDEs en muestras de agua de río

La preparación de muestra para la determinación de PBDEs en muestras de agua de río se llevó a cabo en los mismos recipientes utilizados para el muestreo. Las muestras se recogieron en botellas graduadas, previamente pesadas y etiquetadas, las cuales se rellenaron con unos 500 mL de agua de río (controlados por pesada). Las muestras no se filtraron siguiendo las recomendaciones de la legislación europea que indica que la materia particulada debe ser también incluida en el análisis.⁴ Como ya se ha indicado en la sección C.2.2, en cada punto de muestreo se recogieron dos muestras idénticas, de modo que una de ellas se fortificó con un patrón natural de PBDEs al nivel de concentración establecido por la WFD en sus EQS para aguas superficiales continentales (0,5 pg · g⁻¹) con el fin de evaluar las recuperaciones en muestras reales a estos niveles de concentración.

Sobre todas las muestras (fortificadas y no fortificadas) se añadió una cantidad conocida del patrón de PBDEs marcados en ⁸¹Br (*Tabla 30*) y unos 10 mL de isooctano para llevar a cabo la LLE. Las muestras se agitaron mecánicamente durante unos 30 min y se transfirieron a un embudo de decantación para llevar a cabo la separación de la fase orgánica. Debido a la gran cantidad de materia orgánica presente en las aguas de río, al agitar las muestras para llevar a cabo las extracciones se formaron emulsiones que dificultaron la separación de ambas fases. Por ello en la etapa de extracción se separó toda la fase orgánica, que estaba completamente emulsionada, junto con una pequeña parte de la fase acuosa. Esta mezcla se centrifugó (3000 r.p.m., 5 min) con objeto de romper las emulsiones y conseguir una buena separación de las dos fases. Finalmente se recogió la fase orgánica y el extracto se preconcentró en corriente de nitrógeno hasta alcanzar un volumen final de unos 100 µL. Las muestras se conservaron en la oscuridad a 4 °C hasta su inyección en el sistema GC-(ECNI)MS. Las concentraciones de PBDEs se calcularon mediante la ecuación del IDA elemental, que será descrita con más detalle en la sección C.3.2.2.1.

Tabla 30. Concentración de ^{81}Br -PBDEs añadida a las muestras de agua de río*

Congénere	Concentración de ^{81}Br -PBDEs (pg g ⁻¹)
BDE-28	1,36
BDE-47	6,53
BDE-99	1,14
BDE-100	0,62
BDE-153	1,19
BDE-154	0,08

*Concentraciones calculadas para un peso de muestra de 500 g

C.3.2 Procedimientos matemáticos

C.3.2.1 Calibrado independiente del compuesto (CIC)

La determinación de THMs en aguas de consumo humano se llevó a cabo mediante la metodología del calibrado independiente del compuesto (CIC). Como ya se ha comentado anteriormente, el ICP es una fuente de ionización de las consideradas “duras” ya que atomiza e ioniza todas las moléculas que llegan al plasma a diferencia de lo que ocurre con otras fuentes de ionización consideradas “blandas” como, por ejemplo, el impacto electrónico (EI) o la ionización química (CI) que rompen las moléculas en distintos fragmentos moleculares. Esta propiedad, exclusiva del ICP, ofrece la ventaja teórica de que la respuesta del detector, y por tanto la señal analítica, dependerá exclusivamente de la cantidad de iones del elemento o heteroátomo de interés presentes en el plasma y no de la estructura molecular de la especie que los haya generado.^{5,6,7} Por tanto, para cualquier compuesto orgánico que contenga un heteroátomo X deberá cumplirse la *Ecuación 2*.

$$\text{Señal analítica} = k_X \times [X] \quad (\text{Ecuación 2})$$

k_X : constante de sensibilidad para el elemento X (independiente de la estructura molecular del compuesto), $[X]$: concentración de iones del elemento X en el plasma (X es el elemento de interés).

Si se demuestra que el área de pico obtenida mediante GC-(ICP)MS para un determinado elemento (X) es independiente de la estructura molecular de la especie que lo contiene, sería posible llevar a cabo la cuantificación de gran número de compuestos distintos que contengan ese mismo elemento a través de una única curva

de calibrado elemental. En otras palabras una vez demostrado que k_X es constante sería posible cuantificar cualquier especie que contenga X a través de la *Ecuación 2* conociendo el valor de k_X .

Para aplicar esta metodología de CIC en separaciones cromatográficas es imprescindible que no existan cambios en la sensibilidad con el tiempo ni efectos de matriz que dependan del tiempo de retención del analito ya que afectarían claramente al valor de k_X . Esto impediría, por ejemplo el uso de esta metodología en separaciones con gradiente en LC. Afortunadamente, en las separaciones por GC, la programación de la temperatura del horno no afecta a la sensibilidad analítica por lo que esta metodología sería, *a priori*, factible. Sin embargo, en GC existen otros factores que afectan a la señal analítica como, por ejemplo, la deriva instrumental o la incertidumbre en el volumen inyectado.

La forma más habitual de corregir las variaciones en señal analítica originadas por la deriva instrumental o por pequeñas fluctuaciones en el volumen inyectado es mediante el uso de patrones internos. El compuesto seleccionado como patrón interno para la determinación de una sustancia mediante CIC debe contener el elemento X a través del cual se va a detectar al analito mediante (ICP)MS, no debe estar presente de forma natural en las muestras y debe tener unas características fisicoquímicas semejantes y un tiempo de retención próximo a los analitos de interés.

Así, si se asume que el área del pico cromatográfico obtenido por GC-(ICP)MS para un determinado compuesto es proporcional a la cantidad de iones del elemento X generados en el plasma, la *Ecuación 2* debería cumplirse tanto para el analito como para el patrón interno, que llegan separados al plasma, obteniéndose la *Ecuación 3* para el analito y la *Ecuación 4* para el patrón interno.

$$\text{Área de pico}_{\text{analito}} = k_X \times [X]_{\text{analito}} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

$$\text{Área de pico}_{\text{PI}} = k_X \times [X]_{\text{PI}} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

PI: patrón interno

Dividiendo la *Ecuación 3* por la *Ecuación 4* se obtiene la ecuación final para la determinación de sustancias mediante CIC (*Ecuación 5*). La representación gráfica de esta ecuación será una recta con pendiente 1 y ordenada en el origen 0, lo que

simplifica la determinación de los distintos compuestos que contengan el elemento X ya que no hace falta realizar un calibrado metodológico.

$$\frac{\text{Área de pico}_{\text{analito}}}{\text{Área de pico}_{\text{PI}}} = \frac{[\text{X}]_{\text{analito}}}{[\text{X}]_{\text{PI}}} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Como se puede observar, en la *Ecuación 5* no existe ningún factor de sensibilidad como ocurre con otras estrategias de calibración (calibración externa o por adiciones estándar). Por tanto, es posible determinar distintas sustancias que contengan dicho elemento mediante una única inyección cromatográfica de la muestra a la que se ha añadido una cantidad conocida del patrón interno siempre que previamente se haya demostrado que la respuesta elemental del (ICP)MS es independiente de las especies a medir, que no existe deriva instrumental durante el tiempo que dura cada cromatograma y que no existen otros efectos de matriz.

El compuesto seleccionado como patrón interno para la determinación de los cuatro THMs que deben ser controlados según la legislación vigente, empleando la metodología de CIC, debe ser una sustancia que contenga al menos los dos halógenos (Br y Cl) en su molécula, que no esté presente de forma natural en las muestras y que tenga unas características fisicoquímicas semejantes y un tiempo de retención próximo a los analitos de interés.

A la vista de estos requisitos se empleó el bromotriclorometano (CBrCl₃), que además de cumplir todos los requisitos enumerados anteriormente es una sustancia que se puede conseguir comercialmente con la adecuada pureza, siendo además uno de los compuestos recomendados para su uso como patrón interno en la determinación de algunos HVOCs, entre los que se encuentran los THMs, según la Norma ISO 10301.

Para poder aplicar la metodología de la calibración independiente del compuesto con patrón interno a la determinación de trihalometanos, es necesario demostrar, en primer lugar, que la respuesta del sistema GC-(ICP)MS es realmente independiente de la estructura del compuesto que la genera, es decir, que la *Ecuación 5* se cumple siendo X Cl y Br respectivamente.

Para llevar a cabo esta comprobación se prepararon disoluciones patrón de los cuatro trihalometanos y tetracloruro de carbono en pentano a distintos niveles de concentración (entre 0 y 2 µg·g⁻¹) y se inyectaron en el sistema GC-(ICP)MS, midiéndose las señales a m/z = 35 para el Cl y a m/z = 79 para Br. Los picos

EXPERIMENTAL

cromatográficos se integraron obteniéndose las áreas de los diferentes compuestos y del patrón interno para Cl y Br. Finalmente se representaron los cocientes de las áreas obtenidas para cada compuesto entre el área del patrón interno frente al cociente de sus concentraciones en Cl y Br respectivamente.

Las condiciones experimentales de trabajo utilizadas para llevar a cabo la determinación de THMs en aguas mediante CIC con patrón interno son las que aparecen recogidas en la *Tabla 31*.

Tabla 31. *Condiciones de trabajo del sistema GC-(ICP)MS para la determinación de THMs en aguas*

Parámetros de GC e interfase	
Columna	DB-VRX (60 m × 0.32 mm × 1.8 μm)
Modo de inyección	Sin división de flujo (2 min)
Volumen inyectado	1 μL
Gas portador / presión en el inyector	He / 15 psi
Temperatura de inyección	175 °C
Temperatura de la interfase	255 °C
Programa de temperaturas del horno	45 °C (2 min) hasta 190 °C a 12 °C min ⁻¹ y hasta 245 °C (5 min) a 30 °C min ⁻¹

Parámetros de (ICP)MS	
Potencia de radiofrecuencias	1280 - 1300 W
Posición de la antorcha	5.5 - 6.0 mm
Velocidad de flujo del gas portador	1.37 - 1.45 L min ⁻¹
Velocidad de flujo del gas intermedio	1 L min ⁻¹
Velocidad de flujo del gas exterior	15 L min ⁻¹
Isótopos detectados	³⁵ Cl, ³⁷ Cl, ⁷⁹ Br, ⁸¹ Br
Tiempo de integración	0.05 s por m/z
Parámetros de las lentes	Optimización diaria

C.3.2.2 Análisis por dilución isotópica

La determinación de PBDEs en distintos tipos de muestras biológicas y medioambientales se llevó a cabo mediante IDA, en sus modos de trabajo elemental y molecular. El análisis por dilución isotópica (IDA) es una técnica analítica sencilla que destaca por la gran calidad de sus resultados a nivel metrológico (exactitud y precisión) en comparación con otros métodos clásicos de cuantificación como la calibración externa o adiciones estándar. Esta técnica se basa en la medida de las abundancias isotópicas de un elemento o un fragmento molecular en muestras en las que la composición isotópica del analito ha sido previamente alterada por adición de una cantidad conocida de un elemento o compuesto enriquecido isotópicamente (trazador o *spike*). La relación de abundancias entre las formas marcada y no marcada del analito será constante una vez que se haya conseguido un mezclado homogéneo entre muestra y trazador, lo cual permitirá obtener directamente la concentración del analito en la muestra sin que los resultados se vean afectados por las posibles variaciones de la sensibilidad instrumental, las pérdidas de muestra, las bajas recuperaciones o los efectos de matriz. Por ello se considera que el IDA es un método primario de cuantificación directamente trazable al Sistema Internacional de Unidades y ha sido ampliamente utilizado en diferentes campos de la química analítica para la determinación de distintas sustancias presentes en todo tipo de muestras a muy bajos niveles de concentración (trazas y ultratrazas). El único requisito necesario es que el elemento que se va a utilizar como marca tenga al menos dos isótopos estables o radiactivos de vida media larga que se puedan medir sin interferencias espectrales mediante MS.

C.3.2.2.1 Análisis por dilución isotópica elemental

Inicialmente el IDA se aplicó al análisis elemental total,⁸ empleándose para las medidas distintos sistemas de MS equipados con fuentes capaces de generar iones atómicos del elemento de interés como el ICP⁹ o la fuente de ionización térmica (TI).¹⁰ Así, las abundancias isotópicas se pueden obtener directamente a través de la señal medida para cada uno de los isótopos del elemento de interés, obteniéndose la concentración a través de la ecuación de la IDA elemental.

Por otro lado, a partir de los años 80, el desarrollo de técnicas híbridas con detección por MS dio lugar a la introducción del concepto IDA en el análisis de especiación

elemental.¹¹ En este caso los analitos de interés son separados mediante una técnica analítica de separación adecuada y a continuación son arrastrados hasta el detector de MS, equipado generalmente con una fuente de ICP. Puesto que las especies de interés han sido previamente separadas, llegan al detector de MS a diferentes tiempos, por lo que la relación de abundancias isotópicas para el elemento de interés se pueden obtener midiendo su señal a los tiempos correspondientes a la llegada de cada especie al detector. La aplicación de IDA en especiación elemental permite dos modos de trabajo denominados modo inespecífico o *post-columna*¹² y modo específico.¹³

El modo de IDA inespecífico se basa en la adición del trazador isotópico tras la separación en línea de los compuestos a determinar. Como dichas separaciones se realizan normalmente aplicando un técnica cromatográfica, este modo de IDA se suele denominar *post-columna*. En este modo de trabajo el trazador isotópico se puede añadir en cualquier forma físico-química distinta a la del analito presente en la muestra siempre que previamente se haya demostrado que la eficiencia de la ionización del elemento a medir es independiente de la estructura química del compuesto en el que está presente. Este tipo de IDA es muy útil cuando el trazador isotópico marcado no se puede sintetizar o no está disponible comercialmente o cuando no se conoce la estructura química del analito. Sin embargo el IDA inespecífico presenta una importante desventaja frente al modo de trabajo específico ya que no permite corregir los errores ocurridos antes de que se produzca la mezcla completa entre la muestra y el trazador. Así, todos los errores producidos durante la preparación de la muestra (pérdida de sustancia, diluciones, preconcentraciones, procesos de derivatización, extracciones no cuantitativas desde una matriz sólida, degradación de las especies, etc.) no podrán ser corregidos con este modo de trabajo.

El modo de trabajo de IDA específico emplea como trazador isotópico una mezcla que contiene todas las especies a analizar marcadas isotópicamente en el heteroátomo (elemento distinto de C, H, N y O) de interés. Por tanto, deben conocerse tanto la composición como la estructura de los compuestos a analizar para poder adquirir los distintos trazadores, si existen comercialmente, o bien sintetizarlos en el laboratorio. El trazador se añade a la muestra al inicio del procedimiento analítico y, una vez que se asegure una mezcla completa de la muestra con el trazador, es posible determinar el contenido de cada especie de interés en la muestra aprovechando las ventajas del IDA.

El empleo del IDA elemental para la cuantificación de una sustancia es aplicable en todos aquellos casos en los que el detector de MS utilizado disponga de una fuente de ionización capaz de generar iones atómicos de un determinado elemento o heteroátomo. El principio básico del IDA elemental aparece representado en la *Figura 20* para un elemento que contiene dos isótopos diferentes a y b. Como puede observarse, el isótopo a es el más abundante en la muestra, mientras que el trazador está claramente enriquecido en el isótopo b. Las abundancias isotópicas de la mezcla de ambos, y por tanto las relaciones isotópicas, serán intermedias entre las de la muestra y el trazador, y dependerán tanto de la cantidad de trazador adicionado como de la cantidad original del elemento en la muestra.

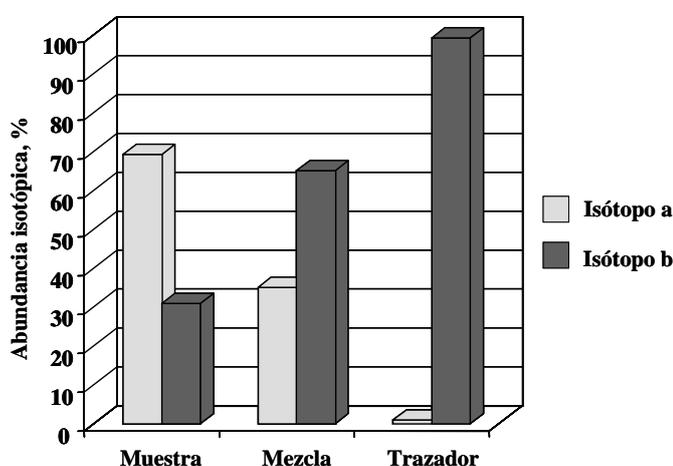


Figura 20. Fundamento del análisis por dilución isotópica para un elemento que contiene dos isótopos (a y b)

A partir de la medida de la relación isotópica en la mezcla se puede calcular la concentración del elemento en la muestra original utilizando la ecuación de la dilución isotópica elemental, cuyo desarrollo matemático se expone a continuación. Si se denomina N_S al número de moles de un elemento poli-isotópico presente en la muestra y N_{Sp} al número de moles del mismo elemento en el trazador, el número de moles del elemento en la mezcla N_m resultante vendrá dado por:

$$N_m = N_S + N_{Sp} \quad (\text{Ecuación 6})$$

De modo similar para los isótopos a y b podemos establecer los siguientes balances de masas:

$$N_m^a = N_S^a + N_{Sp}^a \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$N_m^b = N_S^b + N_{Sp}^b \quad \text{(Ecuación 8)}$$

Si se divide la Ecuación 7 entre la Ecuación 8 se obtiene la relación isotópica de ambos isótopos (a/b) en la mezcla (R_m), la cual puede expresarse de la siguiente manera:

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_S^a + N_{Sp}^a}{N_S^b + N_{Sp}^b} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

El número de moles de cada isótopo en la muestra y el trazador se pueden poner en función de las abundancias de los isótopos a y b en la muestra (A_S^a y A_S^b) y en el trazador (A_{Sp}^a y A_{Sp}^b), de modo que $N_S^a = N_S A_S^a$, $N_{Sp}^a = N_{Sp} A_{Sp}^a$, $N_S^b = N_S A_S^b$, $N_{Sp}^b = N_{Sp} A_{Sp}^b$, llegando a la Ecuación 10.

$$R_m = \frac{N_S A_S^a + N_{Sp} A_{Sp}^a}{N_S A_S^b + N_{Sp} A_{Sp}^b} \quad \text{(Ecuación 10)}$$

Despejando N_S en la Ecuación 9 se obtiene:

$$N_S = N_{Sp} \frac{R_m A_{Sp}^b - A_{Sp}^a}{A_S^a - R_m A_S^b} \quad \text{(Ecuación 11)}$$

La Ecuación 11 es la forma más básica de la ecuación de la dilución isotópica y en ella se puede observar que conociendo la composición isotópica del trazador y la muestra y el número de moles añadidos de trazador se puede calcular el número de moles del elemento en la muestra solamente con la medida de la relación isotópica R_m en la mezcla.

Esta ecuación se puede adaptar para expresar concentraciones en lugar de número de moles. Si se define $R_S = A_S^b/A_S^a$ como la relación isotópica (b/a) en la muestra y $R_{Sp} = A_{Sp}^a/A_{Sp}^b$ como la relación isotópica (a/b) en el trazador se puede expresar la Ecuación 11 como:

$$N_S = N_{Sp} \frac{A_{Sp}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_m - R_{Sp}}{1 - R_m R_S} \right) \quad \text{(Ecuación 12)}$$

Utilizando las expresiones $N_S = C_S m_S/M_S$ y $N_{Sp} = C_{Sp} m_{Sp}/M_{Sp}$, donde C_S y C_{Sp} son las concentraciones del elemento en la muestra y en el trazador, respectivamente, m_S y m_{Sp} son la cantidad tomada de muestra y la cantidad añadida de trazador en peso y M_S y M_{Sp} los pesos atómicos del elemento en la muestra y en el trazador, respectivamente, se obtiene la ecuación final de la dilución isotópica:

$$C_S = C_{Sp} \frac{m_{Sp}}{m_S} \frac{M_S}{M_{Sp}} \frac{A_{Sp}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_m - R_{Sp}}{1 - R_m R_S} \right) \quad \text{(Ecuación 13)}$$

Como se puede observar, todos los parámetros de esta ecuación son conocidos o medibles por lo que la concentración del elemento en la muestra C_S se calcula simplemente a partir de la medida de la relación isotópica R_m mediante MS, sin que sea necesario recurrir a la calibración externa instrumental ni a métodos de adiciones estándar, lo que supone un ahorro considerable del tiempo de análisis respecto a los métodos analíticos convencionales. Además, puesto que la Ecuación 13 no contiene ningún parámetro relacionado con la sensibilidad instrumental cualquier variación de este parámetro debida a inestabilidades instrumentales como la deriva de la señal o los efectos de matriz no tendrá ninguna influencia en el valor final de la concentración del elemento en la muestra (C_S), ya que un isótopo actúa como patrón interno del otro.

Por otra parte, la incertidumbre en la medida de la concentración depende solamente de la incertidumbre de la medida de las relaciones isotópicas R_S , R_{Sp} y R_m , ya que los pesos atómicos de la muestra y del trazador (M_S y M_{Sp}) son conocidos y los pesos de muestra y trazador (m_S y m_{Sp}) pueden determinarse gravimétricamente. En la mayoría de los casos, excepto para ciertos elementos que muestran variaciones naturales en sus abundancias isotópicas, R_S es conocida, mientras que el valor de R_{Sp} se puede determinar previamente o puede ser conocido de antemano si se usa un trazador certificado. Por tanto, el único parámetro que tiene que ser determinado experimentalmente es R_m y esta determinación se puede realizar con una elevada exactitud y precisión utilizando un espectrómetro de masas.

Otra de las ventajas que presenta el IDA es que una vez añadido el isótopo enriquecido y alcanzada la homogeneización entre éste y la muestra, cualquier pérdida de analito de la mezcla no va a tener ninguna influencia en el resultado final. Esto es debido a que cualquier alícuota de la muestra diluida isotópicamente contendrá la misma R_m (permanece invariable) y, por tanto, no será necesario conocer los factores de dilución o preconcentración utilizados, ni tener en cuenta las separaciones no cuantitativas o procesos de evaporación.

Por todas estas ventajas, el análisis por dilución isotópica está considerado internacionalmente como un método de referencia o absoluto, al igual que la gravimetría, volumetría o coulombimetría.¹⁴

Sin embargo, para que todas estas ventajas tengan lugar, se han de cumplirse algunos requisitos. En primer lugar, se tiene que tener en cuenta que cualquier pérdida de analito (ya sea de muestra o de trazador) antes de que se produzca la homogeneización de la mezcla va a suponer una fuente de error considerable. Además, una vez alcanzada dicha homogeneización, el isótopo enriquecido añadido a la muestra deberá comportarse de manera idéntica al elemento natural a lo largo de todo el proceso analítico. Por ejemplo, si el trazador resultase extraído más eficientemente que el analito de la muestra, los resultados obtenidos serían erróneos. Por otra parte, la medida de las intensidades de los isótopos a y b debe estar libre de interferencias espectrales y los factores que afectan a la exactitud de la medida de relaciones isotópicas (como la discriminación de masa o el tiempo muerto del detector) deben estar controlados. Finalmente, también se ha de controlar los valores del blanco ya que cualquier tipo de contaminación que afecte a la muestra isotópicamente diluida conducirá a valores erróneos de la R_m . En el caso de que cualquiera de estos requisitos no se cumpla, la relación isotópica medida R_m que se introduce en la *Ecuación 13* no proporcionará la concentración real del elemento en la muestra (C_S).

En el caso de trabajar en el modo de IDA inespecífico la *Ecuación 13* debe ser transformada para obtener una ecuación de flujo másico a través de la cual se puede calcular fácilmente la concentración del analito (C_S)

$$C_S d_S f_S = C_{Sp} d_{Sp} f_{Sp} \frac{M_S}{M_{Sp}} \frac{A_{Sp}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_m - R_{Sp}}{1 - R_m R_S} \right) \quad \text{(Ecuación 14)}$$

C_S y C_{Sp} : concentraciones de analito en la muestra (S) y el trazador (Sp) respectivamente, d_S y d_{Sp} : densidades, f_S y f_{Sp} : flujos de introducción de muestra y trazador, M_S y M_{Sp} : pesos atómicos, A_{Sp}^b y A_S^a : abundancias isotópicas del isótopo más abundante, R_m , R_S y R_{Sp} : relaciones isotópicas medidas para la mezcla, la muestra y el trazador.

Métodos matemáticos utilizados en la determinación de PBDEs mediante IDA elemental

Como se ha indicado anteriormente, la metodología de IDA permite obtener resultados analíticos de gran exactitud y precisión, sin embargo, para que esto sea así se deben controlar una serie de factores que pueden afectar a la medida de relaciones isotópicas. La discriminación de masas, la presencia de interferencias espectrales y el rango lineal del detector son factores que tradicionalmente afectan a la exactitud de las medidas de relaciones isotópicas cuando se emplean fuentes de ionización elementales como el

ICP, mientras que la precisión suele estar limitada por la estadística de conteo y las fluctuaciones de la fuente de ionización.¹⁵

La fuente de NCI ha sido utilizada ampliamente en la determinación de PBDEs en gran variedad de muestras, especialmente cuando es necesario llevar a cabo su determinación a muy bajos niveles de concentración, ya que ofrece una mayor sensibilidad con respecto a otras fuentes de ionización como la de EI cuando se trabaja con un analizador de masas de baja resolución.

En el análisis de PBDEs la fuente de NCI, en condiciones normales de trabajo, es capaz de generar iones atómicos negativos de Br, por lo que *a priori* sería aplicable la ecuación del IDA elemental para la cuantificación de este tipo de compuestos. Puesto que se dispone de cada compuesto de interés marcado isotópicamente en ⁸¹Br el modo de cuantificación sería el específico, aplicándose la *Ecuación 13* para el cálculo de las concentraciones de cada congénere de interés en las muestras. Las abundancias isotópicas en la mezcla se pueden obtener directamente integrando las áreas del pico cromatográfico correspondiente a cada congénere para cada uno de sus dos isótopos ($m/z = 79$ y 81), el más abundante en el trazador (b) y en la muestra (a), de modo que $R_m = A_s^a/A_{sp}^b$.

Sin embargo, este tipo de fuente de ionización no ha sido empleada hasta el momento para la medida de relaciones isotópicas por lo que fue necesario evaluarla en términos de exactitud y precisión para la medida de relaciones isotópicas de bromo.

Las interferencias espectrales son uno de los factores que pueden afectar a la exactitud en la medida de las relaciones isotópicas, de hecho el IDA elemental solamente se puede llevar a cabo cuando el elemento de interés posee al menos dos isótopos libres de interferencias.¹⁵ Las interferencias espectrales tienen lugar por la llegada al analizador de masas de ciertos iones, generados o no en la fuente de ionización, diferentes al elemento de interés pero que presentan su misma relación m/z . La fuente de ionización de NCI aporta gran selectividad a la técnica de MS ya que, como se ha indicado en la sección A.3.1.2, esta fuente solamente será capaz de ionizar aquellas sustancias que contengan grupos electrofílicos capaces de captar electrones térmicos, por lo que se reduce en gran medida la posibilidad de que se produzcan interferencias espectrales.¹⁶

La linealidad del detector también es un factor que puede afectar a la exactitud de las medidas cuando las relaciones isotópicas están bastante alejadas de 1. Puesto que las señales medidas se registran en el modo de conteo de pulsos, es decir, número de pulsos por unidad de tiempo, cuando la velocidad de conteo es muy elevada ($>10^6$ cuentas por segundo) el detector no es capaz de detectar la llegada de dos iones como dos eventos individuales, por lo que los contabiliza como un único evento. Este efecto denominado efecto de tiempo muerto del detector implica que se registrarán menos iones de los que realmente llegan al detector. Dado que la pérdida de cuentas es función del número de iones que llegan al detector por unidad de tiempo, cuando se mide una relación isotópica distinta de la unidad, la pérdida de cuentas para los dos isótopos será de distinta magnitud y, por tanto, la relación isotópica medida será diferente de la real. Por tanto, este parámetro debe ser evaluado para corregir las intensidades y como consecuencia las relaciones isotópicas. Una vez conocido el tiempo muerto del detector, las intensidades se pueden corregir utilizando la *Ecuación 15* en aquellos casos en los que sea necesario.

$$I_{\text{corregida}} = \frac{I_{\text{medida}}}{1 - I_{\text{medida}}\tau} \quad \text{(Ecuación 15)}$$

I: intensidad medida experimentalmente o corregida, τ : tiempo muerto (s)

Otro de los factores que puede afectar a la exactitud en la medida de relaciones isotópicas es la discriminación de masas, esto es, el transporte diferencial de iones que presentan distinta relación m/z a través del MS. Este factor resulta de especial importancia cuando la medida de la relación isotópica se lleva a cabo en señales transientes, como ocurre en la determinación de PBDEs, donde los distintos congéneres son separados por GC previamente a su detección. Para corregir el efecto de discriminación de masas en la medida de relaciones isotópicas generalmente se utilizan patrones naturales con composición isotópica perfectamente conocida, los cuales se inyectan en el sistema de medida para poder calcular el factor de discriminación de masas (k) que permite corregir este efecto.

Para evaluar el efecto de la discriminación de masas y estudiar la linealidad del detector se inyectaron patrones naturales de PBDEs consistentes en una mezcla de varios congéneres (desde tri- hasta hexabromados) a distintos niveles de concentración (0,5 - 2000 ng g^{-1}) en los dos equipos de GC-MS equipados con la fuente de ionización de NCI descritos en la sección C.1.3. Para el estudio de la discriminación de masas se

calcularon las relaciones isotópicas experimentales como la relación de señales de cada isótopo (relación de áreas de pico $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) para cada congénere a los diferentes niveles de concentración estudiados y se compararon con el valor obtenido teóricamente. Para el estudio de la linealidad del detector se representaron las señales obtenidas para cada isótopo (área de pico para $m/z = 79$ y 81) frente a la concentración de cada congénere y se calcularon los correspondientes coeficientes de regresión lineal.

Para corregir el efecto de discriminación de masas en la medida de relaciones isotópicas se inyectó un patrón natural, con una composición isotópica perfectamente conocida, en el sistema GC-(NCI)MS a intervalos regulares para poder calcular y controlar el factor de discriminación de masas (k). En concreto en este trabajo se utilizó el modelo exponencial, que viene dado por la *Ecuación 16*, para el cálculo del factor k .

$$k = \frac{\ln \frac{R_{\text{experimental}}}{R_{\text{teórica}}}}{\Delta m} \quad \text{(Ecuación 16)}$$

k : factor de discriminación de masas, R : relación isotópica teórica o experimental, Δm : diferencia de masas entre los isotopos a medir

Una vez calculado k se pueden corregir las relaciones isotópicas obtenidas experimentalmente a través de la *Ecuación 17*.

$$R_{\text{corregida}} = \frac{R_{\text{experimental}}}{e^{k \cdot \Delta m}} \quad \text{(Ecuación 17)}$$

R : relación isotópica experimental o corregida, k : factor de discriminación de masas, Δm : diferencia de masas entre los isotopos a medir

Por otro lado, los principales parámetros que afectan a la precisión en la medida de relaciones isotópicas cuando se trabaja con detectores que trabajan en el modo de conteo de iones, son las fluctuaciones de la fuente de ionización y la estadística de conteo. Todos los instrumentos utilizados en este trabajo constan de un detector de este tipo, el multiplicador de electrones secundarios (SEM), que ha sido ampliamente utilizado en MS debido a su gran capacidad para amplificar la señal de los iones que lo alcanzan. Se sabe que para algunos instrumentos que poseen este tipo de detector, como el (ICP)MS, la precisión es baja cuando se miden señales analíticas bajas y mejora al aumentar la señal medida siguiendo la estadística de Poisson hasta que, para señales muy elevadas, la precisión queda finalmente limitada por las fluctuaciones producidas en la fuente de ionización.¹⁵ Por tanto fue necesario evaluar el rango de intensidad de

señal para el cual se pueden llevar a cabo las medidas de relaciones isotópicas con una precisión adecuada para la cuantificación de PBDEs. Para ello se representó la precisión expresada como RSD (%) en medidas de relaciones isotópicas experimentales para muestras y patrones ($n = 3$ inyecciones) frente al área de pico para $m/z = 79$.

Otro factor importante a tener en cuenta a la hora de llevar a cabo una cuantificación mediante la metodología de IDA elemental es la propagación de errores aleatorios, que depende de la cantidad de trazador añadida a la muestra. Esta cantidad puede ser optimizada calculando el rango óptimo de la relación entre la muestra y el trazador en el que se minimicen los errores estadísticos.¹⁷ Aplicando la teoría de propagación de los errores en la *Ecuación 13* se obtiene la siguiente expresión para la varianza de la concentración en la muestra $s(C_s)^2$:

$$s(C_s)^2 = \left[\frac{\partial C_s}{\partial m_{Sp}} \right]^2 s(m_{Sp})^2 + \left[\frac{\partial C_s}{\partial m_s} \right]^2 s(m_s)^2 + \left[\frac{\partial C_s}{\partial M_{Sp}} \right]^2 s(M_{Sp})^2 + \left[\frac{\partial C_s}{\partial M_s} \right]^2 s(M_s)^2 + \left[\frac{\partial C_s}{\partial A_{Sp}^b} \right]^2 s(A_{Sp}^b)^2 + \left[\frac{\partial C_s}{\partial A_s^a} \right]^2 s(A_s^a)^2 + \left[\frac{\partial C_s}{\partial R_s} \right]^2 s(R_s)^2 + \left[\frac{\partial C_s}{\partial R_{Sp}} \right]^2 s(R_{Sp})^2 + \left[\frac{\partial C_s}{\partial R_m} \right]^2 s(R_m)^2 \quad \text{(Ecuación 18)}$$

Tomando derivadas parciales y agrupando la expresión se obtiene la *Ecuación 19*.

$$\left[\frac{s(C_s)}{C_s} \right]^2 = \left[\frac{s(m_{Sp})}{m_{Sp}} \right]^2 + \left[\frac{s(m_s)}{m_s} \right]^2 + \left[\frac{s(M_{Sp})}{M_{Sp}} \right]^2 + \left[\frac{s(M_s)}{M_s} \right]^2 + \left[\frac{s(A_{Sp}^b)}{A_{Sp}^b} \right]^2 + \left[\frac{s(A_s^a)}{A_s^a} \right]^2 + \left[\frac{R_m R_s}{1 - R_m R_s} \right]^2 \left[\frac{s(R_s)}{R_s} \right]^2 + \left[\frac{-R_{Sp}}{R_m - R_{Sp}} \right]^2 \left[\frac{s(R_{Sp})}{R_{Sp}} \right]^2 + \left[\frac{R_m(1 - R_{Sp} R_s)}{(R_m - R_{Sp})(1 - R_m R_s)} \right]^2 \left[\frac{s(R_m)}{R_m} \right]^2 \quad \text{(Ecuación 19)}$$

Considerando que las incertidumbres asociadas a cada una de las variables que aparecen en la *Ecuación 13* son constantes, el único parámetro a optimizar es la relación isotópica en la mezcla, por lo que en la *Ecuación 19* se puede transformar en la *Ecuación 20*.

$$\left[\frac{s(C_s)}{C_s} \right] = \left[\frac{R_m(1 - R_{Sp} R_s)}{(R_m - R_{Sp})(1 - R_m R_s)} \right] \cdot \left[\frac{s(R_m)}{R_m} \right] \quad \text{(Ecuación 20)}$$

Siendo $s(C_s)^2/C_s$ el error relativo en la concentración determinada y $s(R_m)/R_m$ el error relativo en medida de la relación isotópica de la mezcla entre los compuestos de abundancias naturales y los marcados isotópicamente. El otro factor es el denominado factor de magnificación de error $f(R)$ que se muestra en la *Ecuación 21*. Este factor depende de la relación isotópica de la mezcla (R_m), la relación isotópica en la muestra (R_s) con abundancias isotópicas naturales, y la relación isotópica del patrón marcado

(R_{Sp}). Puesto que R_S y R_{Sp} son constantes para un elemento particular y para un determinado patrón marcado, solamente R_m puede ser optimizada para minimizar el error en los resultados.

$$f(R) = \left[\frac{R_m(1 - R_{Sp}R_S)}{(R_m - R_{Sp})(1 - R_mR_S)} \right] \quad \text{(Ecuación 21)}$$

Como R_S y R_{Sp} no pueden ser optimizadas, los valores de $f(R)$ se pueden representar frente a R_m para obtener el rango en el que la magnificación del error sea mínimo. Una vez conocido este intervalo la cantidad de trazador que se añade a la muestra puede ser fácilmente optimizada. Ésta es la razón por la que, para poder aplicar la metodología de IDA, es necesario tener una idea aproximada del nivel de concentración del analito en la muestra. A partir de este dato, se deben calcular los pesos de muestra y trazador a mezclar para obtener un R_m próximo al valor óptimo.

La *Figura 21* muestra la variación de $f(R)$ frente a la relación isotópica $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ para distintos trazadores isotópicos enriquecidos en ^{81}Br al 99,53% (BDEs 28, 47, 49, 99 y 100), 88,99% (BDE 154) y 80,51% (BDE 153) según el congénere. Como se puede ver en la gráfica, para los congéneres 28, 47, 49, 99 y 100 valores de R_m entre 0,02 y 0,50 proporcionan valores de $f(R_m)$ inferiores a 2, considerados aceptables, con un valor mínimo de $f(R_m)$ de 1,15 en torno a $R_m = 0,08$. Estos valores corresponden a relaciones entre la concentración del compuesto natural y el marcado en el rango que va de 1:35 a 1:0,5 siendo 1:6 la relación óptima. Desafortunadamente los congéneres BDE 153 y 154 enriquecidos no presentan estas mismas características, de modo que su rango óptimo en sus correspondientes curvas de magnificación de error se estrechan y presentan valores más altos para el error propagado.

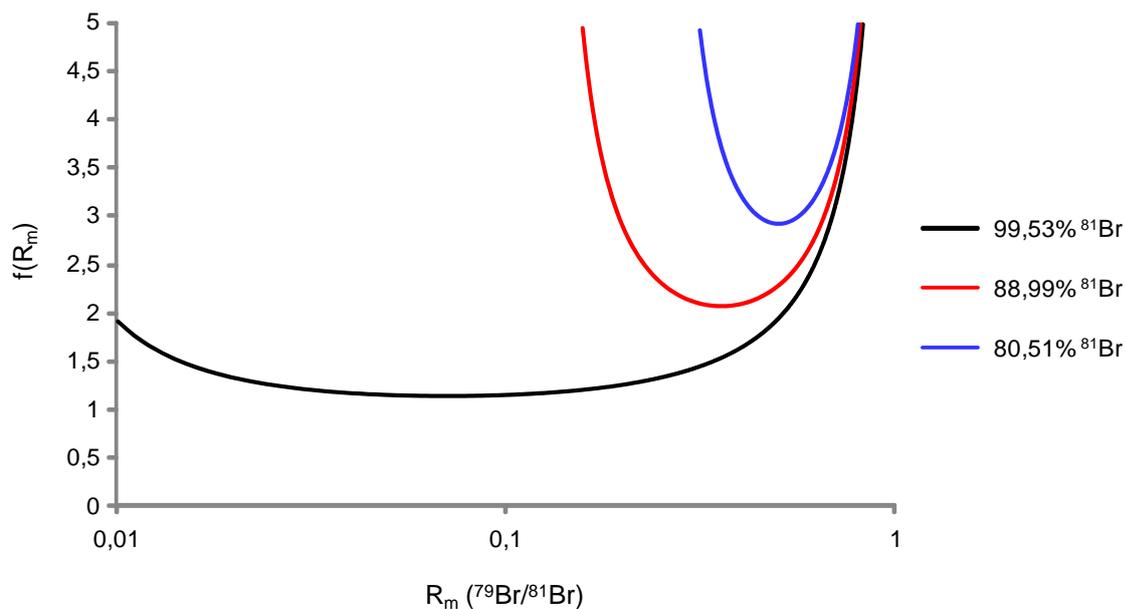


Figura 21. Curva de magnificación de error para los patrones marcados de PBDEs enriquecidos en ^{81}Br

Finalmente, las condiciones experimentales de trabajo empleadas para la determinación de PBDEs en muestras biológicas y medioambientales mediante IDA elemental así como para la caracterización de los patrones marcados en concentraciones y abundancias isotópicas mediante IDA inversa aparecen recogidas en la *Tabla 32* para el sistema GC-(ICP)MS y en la *Tabla 33* para GC-(NCI)MS.

Tabla 32. *Condiciones de trabajo del sistema GC-(ICP)MS para su aplicación a IDA elemental*

Parámetros de GC e interfase	
Columna	TRD 5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)
Modo de inyección	Sin división de flujo (1,5 min)
Volumen inyectado	1 μL
Gas portador / presión en el inyector	He / 25 psi (presión constante)
Temperatura de inyección	270 °C
Temperatura de la interfase	270 °C
Programa de temperaturas del horno	120 °C hasta 300 °C (11 min) a 30 °C min ⁻¹
Parámetros de (ICP)MS	
Potencia de radiofrecuencias	1280 - 1300 W
Posición de la antorcha	5,5 – 6,0 mm
Velocidad de flujo del gas portador	1,37 – 1,45 L min ⁻¹
Velocidad de flujo del gas intermedio	1 L min ⁻¹
Velocidad de flujo del gas exterior	15 L min ⁻¹
Isótopos detectados	⁷⁹ Br, ⁸¹ Br
Tiempo de integración	0,05 s por m/z
Parámetros de las lentes	Optimización diaria

Tabla 33. *Condiciones de trabajo del sistema GC-(NCI)MS para su aplicación a IDA elemental*

Parámetros de GC e interfase	
Columna	DB-5MS UI (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)
Modo de inyección	Sin división de flujo (2 min) con pulso de presión
Pulso de presión	200 kPa, 1,5 min
Volumen inyectado	2 μL
Gas portador / presión en el inyector	He / 2 mL·min ⁻¹ (flujo constante)
Temperatura de inyección	300 °C
Temperatura de la interfase	280 °C
Programa de temperaturas del horno	120 °C hasta 300 °C (10 min) a 30 °C min ⁻¹
Parámetros de (NCI)MS	
Temperatura de la fuente	230 °C
Voltaje de la fuente	70 V
Corriente de emisión	150 μA
Gas reactivo	CH ₄
Modo de adquisición	SIM
Isótopos detectados	⁷⁹ Br, ⁸¹ Br
Tiempo de integración	50 ms
Ventana del disolvente	3,5 min

C.3.2.2.2 Análisis por dilución isotópica molecular

El IDA también se ha aplicado en el campo del análisis de compuestos orgánicos mediante el empleo de patrones del compuesto orgánico a analizar enriquecido isotópicamente en ¹³C, ²H, ¹⁸O ó ¹⁵N. Al igual que en el IDA elemental, el principio básico reside en obtener la concentración del analito por medio de la medida de la relación isotópica en la mezcla entre la muestra y el trazador, la cual teóricamente permanece constante a lo largo de los distintos procesos analíticos. Sin embargo, existen dos limitaciones importantes respecto al IDA elemental que son los efectos isotópicos y el solapamiento espectral.

Los efectos isotópicos son los cambios en el comportamiento de las sustancias marcadas isotópicamente con respecto a las no marcadas. Estos cambios se deben a las pequeñas diferencias en las propiedades fisicoquímicas entre el analito presente en la muestra y en el trazador, derivadas de la diferencia en masa entre ambos. Los efectos isotópicos observados son más pronunciados cuanto mayor es la diferencia relativa en masa entre el isótopo marcado y el no marcado por lo que se suele recomendar el uso de patrones marcados en elementos con pesos atómicos no demasiado bajos (C o N) o, en caso de tener que recurrir a elementos que presenten una gran diferencia relativa en masa entre los dos isótopos de trabajo (H), se recomienda utilizar trazadores que contengan el número mínimo de átomos marcados (marcaje mínimo) con el fin de minimizar los posibles efectos isotópicos, que suelen conllevar cambios en los tiempos de retención y diferentes recuperaciones entre las formas marcada y no marcada del analito.¹⁸

Por otro lado, las fuentes de ionización utilizadas en el campo del análisis orgánico, como la fuente de ionización de EI o el electrospray, producen fragmentos moleculares que suelen estar agrupados en los denominados clústers isotópicos. Un determinado compuesto orgánico produce un clúster isotópico para cada fragmento molecular en el que se incluye no sólo la masa nominal m del fragmento, sino también (y en menor medida) las masas $m+1$, $m+2$ o incluso mayores debido a la presencia natural de otros isótopos de los elementos que componen (^{13}C , ^2H , ^{15}N , etc.). Por tanto, cuando se introduce un compuesto marcado isotópicamente en una muestra puede producirse un solapamiento espectral de los clústers isotópicos correspondientes al analito en la muestra y en el trazador. Este inconveniente se suele evitar trabajando con trazadores que posean una masa significativamente distinta a la del compuesto de abundancias isotópicas naturales de forma que la diferencia en m/z entre ambos clústers sea lo suficientemente amplia como para que no se produzca el solapamiento espectral. Sin embargo, la necesidad de una separación completa de los clústers de medida correspondientes al analito y el trazador se contrapone a la necesidad de un marcaje mínimo para evitar o minimizar los efectos isotópicos (especialmente cuando la marca va en los átomos de H) por lo que a veces puede resultar complicado encontrar las condiciones ideales para poder aplicar el IDA a la determinación de sustancias orgánicas.

Como consecuencia, debido por un lado a los posibles efectos isotópicos y por otro lado al posible solapamiento espectral entre los clústers de medida del analito y el trazador, la cuantificación de sustancias orgánicas no se puede llevar a cabo a través de la ecuación del IDA elemental (*Ecuación 13*) donde la relación isotópica (relación de intensidades del espectro de masas) de la mezcla entre la muestra y el trazador proporciona directamente la concentración inicial del analito, sino que se suele recurrir a procedimientos de calibración, basados en la medida de la relación isotópica en mezclas definidas de trazador y analito utilizando patrones de calibrado.^{19,20} En estos casos, el trazador isotópico se utiliza como un patrón interno análogo al analito a determinar. La curva de calibración obtenida solamente es lineal cuando no existen solapamientos espectrales entre muestra y trazador y posee una pendiente próxima a uno en función de las abundancias isotópicas del compuesto marcado y no marcado respectivamente. Por otro lado, esta pendiente puede sufrir algunos cambios cuando existen pequeñas variaciones en propiedades fisicoquímicas de ambas formas del analito. Por ello será imprescindible evaluar en cada caso la respuesta del sistema frente a la concentración del analito a través de un calibrado metodológico, perdiéndose así la ventaja que ofrece el IDA de obtener directamente la concentración del analito a partir de la relación entre las señales generadas por ambos.

Marcaje con heteroátomos

Como se ha visto anteriormente el mejor modo de minimizar los efectos isotópicos en la determinación de sustancias orgánicas mediante IDA es recurriendo al marcaje mínimo. En muchos casos los compuestos orgánicos de interés suelen contener algún heteroátomo en su molécula, entendiéndose por heteroátomo cualquier elemento diferente de C, H, N y O con al menos dos isótopos estables, por lo que sería posible introducir la marca en este elemento como alternativa al marcaje mínimo. De este modo la diferencia relativa en masa entre los dos isótopos de dicho heteroátomo sería menor que la de cualquiera de los elementos empleados tradicionalmente en el marcaje de compuestos orgánicos, por lo que se minimizarían igualmente los efectos isotópicos. La estrategia del marcaje con heteroátomos ha sido utilizada fundamentalmente en la especiación elemental de compuestos organometálicos mediante IDA en combinación con MS con fuentes de ionización elementales como el ICP,^{21,22,13} aunque también existen algunos ejemplos en los que se ha utilizado la fuente de EI, clásicamente utilizada en la determinación de sustancias orgánicas.^{23,24,25} La principal ventaja

derivada del empleo de la estrategia de marcaje con heteroátomos es que el mismo patrón marcado se puede utilizar para la determinación del analito por IDA tanto en su modo elemental, aprovechando las buenas características analíticas que ofrecen las fuentes de ionización elementales (ICP, NCI) en términos de selectividad y sensibilidad, como en el modo molecular (EI), permitiendo obtener información estructural e identificar los analitos evitando completamente el problema de los efectos isotópicos.

Deconvolución de perfiles isotópicos

Como se ha indicado anteriormente los solapamientos espectrales entre los clústers de medida del analito y el trazador son una de las causas que impiden la determinación de sustancias orgánicas en una muestra siguiendo el procedimiento matemático clásicamente utilizado para la cuantificación de sustancias mediante IDA (*Ecuación 13*). Afortunadamente, el problema del solapamiento espectral se puede solventar fácilmente recurriendo a la deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) que es una herramienta matemática que permite calcular la contribución individual de cada una de las especies o formas que contribuyen a la señal total obtenida para una determinada m/z . La principal diferencia que presenta el IPD frente al procedimiento empleado clásicamente en los cálculos de IDA es que emplea para los cálculos abundancias isotópicas en lugar de relaciones isotópicas. Mediante esta metodología se asume que la señal total observada para el conjunto de m/z que conforman el clúster de medida de una determinada sustancia es una combinación lineal de distintos perfiles isotópicos correspondientes a distintas especies o formas de la misma presentes en el MS. Llevando a cabo un ajuste mediante mínimos cuadrados múltiples se obtienen como resultados las fracciones molares de cada uno de los perfiles isotópicos que contribuyen a la señal total, a través de las cuales es posible llevar a cabo la cuantificación de la sustancia de interés.

De forma general, se denomina perfil isotópico al conjunto de abundancias isotópicas relativas de todos los isótopos estables de un elemento de modo que la suma de todas las abundancias isotópicas relativas de cualquier perfil isotópico debe ser siempre igual a la unidad. Este concepto se puede aplicar también a moléculas en lugar de elementos siendo el perfil isotópico molecular el conjunto de abundancias relativas de los distintos fragmentos moleculares que puede formar un determinado compuesto en función de las abundancias isotópicas de sus elementos constituyentes. El perfil

isotópico de un elemento o compuesto puede medirse experimentalmente mediante MS utilizando distintas fuentes de ionización. El concepto utilizado para designar el perfil isotópico molecular en compuestos orgánicos es el de *mass isotopomer distribution* que se podría traducir como distribución de isotopómeros de masa, aunque a lo largo de este trabajo se utilizará el término perfil isotópico para expresar las distribuciones isotópicas moleculares en compuestos químicos por sencillez y analogía con los conceptos elementales.

El perfil isotópico de un elemento o compuesto que se encuentra en la naturaleza, y por tanto en las muestras a analizar, se denomina perfil isotópico natural y se puede considerar constante e invariable en todo el planeta. Las abundancias isotópicas naturales de los elementos están tabuladas incluyendo sus incertidumbres por lo que el perfil isotópico natural de cualquier compuesto químico puede calcularse fácilmente. Cuando utilizamos un elemento o compuesto enriquecido isotópicamente en uno de sus elementos constituyentes podemos hablar de un perfil isotópico alterado. En este perfil isotópico las abundancias relativas serán claramente distintas a las del compuesto natural. Sin embargo, conocidas las abundancias del elemento utilizado para alterar la composición isotópica del compuesto también se puede calcular fácilmente el perfil isotópico del compuesto enriquecido. El programa de cálculo utilizado para obtener las abundancias relativas que definen los perfiles isotópicos de los compuestos naturales y marcados isotópicamente será descrito más adelante.

La metodología de IPD se utilizó inicialmente como herramienta matemática para el estudio de interferencias isobáricas^{26,27} y la corrección de los errores que éstas provocan en la cuantificación mediante IDA. Sin embargo, posteriormente se observó que esta metodología de cálculo ofrece también otras ventajas importantes frente al modelo matemático tradicional ya que permite la corrección interna de la discriminación de masas,²⁸ el estudio y corrección de los procesos de interconversión de especies,^{25,29} la separación de perfiles isotópicos solapados en el espectro de masas^{25,30} y el estudio de procesos de metabolismo.^{28,29,31}

El análisis por dilución isotópica orgánica requiere la preparación de mezclas que contengan el mismo compuesto con dos perfiles isotópicos distintos, un perfil isotópico natural y otro alterado, es decir, a una muestra que contiene un compuesto con una abundancia isotópica natural se le añade una cantidad conocida del mismo compuesto con una abundancia isotópica alterada.

El balance de masas para el número de moles totales del compuesto en la muestra, N_m , vendrá dado por la Ecuación 22.

$$N_m = N_S + N_{Sp} \quad (\text{Ecuación 22})$$

Donde N_S es la cantidad (moles) de compuesto con abundancia isotópica natural y N_{Sp} es la cantidad conocida (moles) de compuesto marcado o trazador añadido a la mezcla y que tiene la abundancia isotópica alterada. De manera semejante se pueden plantear balances de masas análogos para cada isotópomo (m/z perteneciente a un clúster correspondiente al fragmento molecular que se utilizará para la cuantificación) al que el analito o el trazador generen una señal, obteniéndose la Ecuación 23 para cualquier isotópomo i .

$$N_m^i = N_S^i + N_{Sp}^i \quad (\text{Ecuación 23})$$

Cuando se utilizan fuentes de ionización moleculares como la EI y se trabaja con analizadores de masas de baja resolución como el cuadrupolo, pueden coexistir distintas composiciones isotópicas de un mismo compuesto con la misma masa nominal. En la *Tabla 34* se muestra un ejemplo en el que la presencia de un átomo de ^{13}C o un ^2H en la molécula de CH_4 proporcionan dos composiciones isotópicas diferentes con la misma masa nominal. En el desarrollo de las ecuaciones necesarias para realizar los cálculos de IDA mediante IPD se utilizará el concepto de isotópomo por lo que todas esas posibles composiciones isotópicas se sumarán para cada masa nominal utilizando la distribución de isotómeros de masa (*mass isotopomer distribution*) en los correspondientes cálculos.

Tabla 34. Distribución de isotómeros de masa para CH_4

Isotópomo (m/z)	Composición isotópica	Abundancias relativas	Perfil isotópico
16	$^{12}\text{C}^1\text{H}_4$	0,988845	
17	$^{13}\text{C}^1\text{H}_4, ^{12}\text{C}^1\text{H}_3^2\text{H}$	0,011150	
18	$^{13}\text{C}^1\text{H}_3^2\text{H}, ^{12}\text{C}^2\text{H}_2^2\text{H}_2$	0,000005	

Así, la *Ecuación 23* se puede reescribir en función de las abundancias isotópicas relativas, A^i , mediante la *Ecuación 24*.

$$N_m \cdot A_m^i = N_S \cdot A_S^i + N_{Sp} \cdot A_{Sp}^i \quad \text{(Ecuación 24)}$$

Donde A_m^i representa la abundancia relativa medida experimentalmente del compuesto para el isotópomo de masa nominal i en la mezcla, A_S^i es la abundancia teórica relativa del compuesto natural a la misma masa nominal i y A_{Sp}^i es la abundancia teórica relativa del compuesto isotópicamente enriquecido también a la masa nominal i . Dividiendo la *Ecuación 24* entre la *Ecuación 22* obtenemos la *Ecuación 25*.

$$A_m^i = X_S \cdot A_S^i + X_{Sp} \cdot A_{Sp}^i \quad \text{(Ecuación 25)}$$

Donde X_S y X_{Sp} son las fracciones molares del compuesto en la mezcla procedentes de cada perfil isotópico.

$$X_S = \frac{N_S}{N_S + N_{Sp}} \quad \text{(Ecuación 26)}$$

$$X_{Sp} = \frac{N_{Sp}}{N_S + N_{Sp}} \quad \text{(Ecuación 27)}$$

Si tenemos un compuesto que tiene distintas composiciones isotópicas y n isotómeros para n masas nominales distintas, podemos establecer una ecuación similar a la *Ecuación 25* para cada masa nominal que se puede expresar en forma matricial según la *Ecuación 28*.

$$\begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ A_m^3 \\ \dots \\ A_m^{n-1} \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_S^1 & A_{Sp}^1 \\ A_S^2 & A_{Sp}^2 \\ A_S^3 & A_{Sp}^3 \\ \dots & \dots \\ A_S^{n-1} & A_{Sp}^{n-1} \\ A_S^n & A_{Sp}^n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_S \\ X_{Sp} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad \text{(Ecuación 28)}$$

Donde las abundancias isotópicas relativas en la muestra y en el trazador (A_S^i y A_{Sp}^i , $i= 1, \dots, n$) son fijas y sus valores teóricos se pueden obtener fácilmente utilizando el programa de cálculo que se describirá con más detalle en la sección siguiente, mientras que las abundancias isotópicas relativas de la mezcla se pueden obtener experimentalmente a través de la medida de las áreas de pico obtenidas para cada masa nominal (m/z), siendo las fracciones molares (X_S y X_{Sp}) las únicas incógnitas en este sistema de ecuaciones.

El número mínimo de grados de libertad necesarios para poder resolver el sistema de ecuaciones es de dos, por lo que será necesario plantear al menos dos ecuaciones ($n \geq 2$), que permitirán obtener los valores de las fracciones molares mediante un ajuste por mínimos cuadrados del vector error e . Si se denomina Y al vector de las abundancias isotópicas en la mezcla, A a la matriz con las abundancias teóricas de los compuestos puros y X al vector de las fracciones molares desconocidas, la solución del ajuste por mínimos cuadrados a este sistema de ecuaciones puede calcularse mediante la *Ecuación 29*.

$$X = (A' \times A)^{-1} \times (A' \times Y) \quad \text{(Ecuación 29)}$$

Donde A' es la transpuesta de la matriz A y el superíndice -1 indica la inversa de la matriz resultante del producto.

En aquellos casos en los que el número de ecuaciones planteadas sea superior al número de incógnitas, los grados de libertad restantes permiten calcular otros datos que pueden resultar de interés como las incertidumbres asociadas a cada incógnita.

Todos los cálculos matriciales pueden resolverse por medio de hojas de cálculo utilizando la función de *ESTIMACION.LINEAL* de *Excel*, que permite obtener directamente las fracciones molares junto con sus incertidumbres. En la *Figura 22* se puede ver un ejemplo de la hoja de cálculo utilizada para el cálculo de fracciones molares mediante esta función de *Excel*.

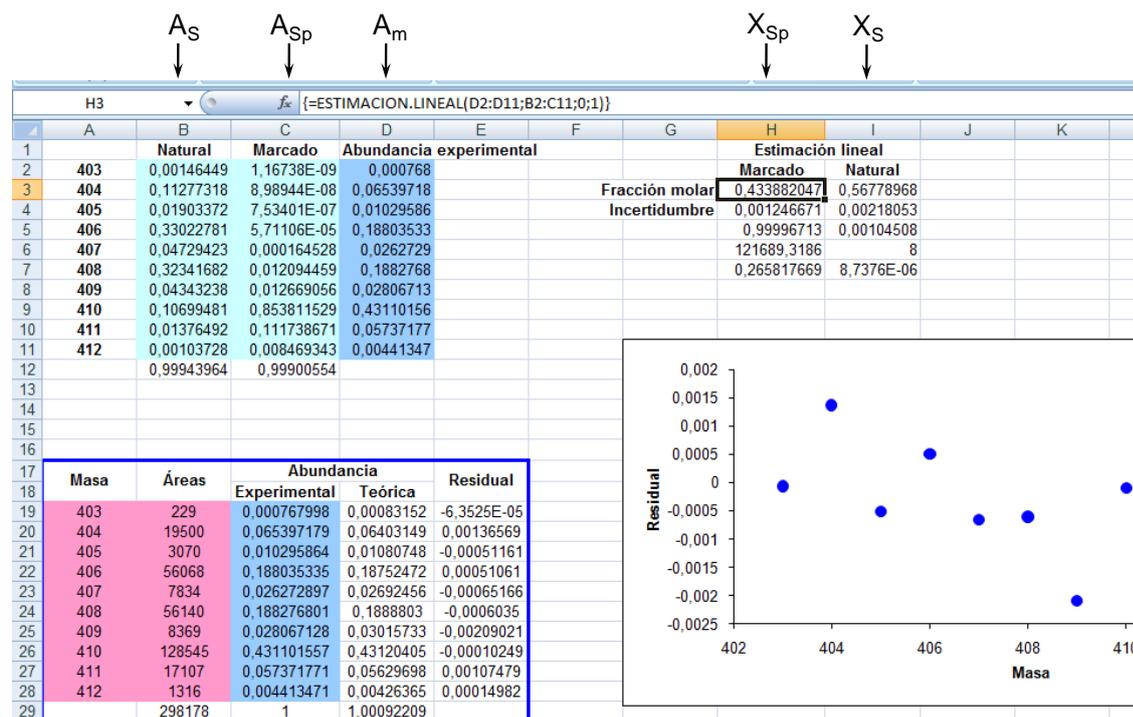


Figura 22. Cálculo de fracciones molares mediante la función ESTIMACIÓN.LINEAL

Finalmente, como la cantidad de compuesto marcado añadido es conocido, la cantidad de compuesto natural en la muestra se puede calcular mediante la Ecuación 30.

$$\frac{N_S}{N_{Sp}} = \frac{X_S}{X_{Sp}} = R \quad \text{(Ecuación 30)}$$

En la Ecuación 30 se sustituye el número de moles del compuesto natural (N_S) y del trazador (N_{Sp}) según la Ecuación 31 y la Ecuación 32.

$$N_S = \frac{m_S \cdot C_S}{PM_S} \quad \text{(Ecuación 31)}$$

$$N_{Sp} = \frac{m_{Sp} \cdot C_{Sp}}{PM_{Sp}} \quad \text{(Ecuación 32)}$$

Donde m_S y m_{Sp} son los pesos tomados de muestra y trazador respectivamente para preparar la mezcla, C_S y C_{Sp} son las concentraciones del analito en la muestra y del trazador respectivamente y PM_S y PM_{Sp} son los pesos moleculares del analito y el trazador respectivamente

Finalmente se obtiene la Ecuación 33 que permite obtener la concentración del compuesto de interés en la muestra.

$$C_S = C_{Sp} \cdot \frac{m_S}{m_{Sp}} \cdot \frac{PM_{Sp}}{PM_S} \cdot \frac{X_S}{X_{Sp}} \quad \text{(Ecuación 33)}$$

Cabe destacar que cuando se representa la relación de fracciones molares R_m (x_s/x_{sp}) frente a la relación de moles (N_s/N_{sp}) se obtiene una recta de pendiente 1 y ordenada en el origen 0 independientemente del marcaje del compuesto enriquecido siempre que no existan efectos isotópicos durante la preparación de muestra. Esto evita la necesidad de realizar un calibrado y permite cuantificar directamente el compuesto de interés, de una manera análoga a como se realiza en la dilución isotópica elemental.

Cálculo de perfiles isotópicos

El perfil isotópico teórico de una molécula se puede calcular de forma relativamente sencilla cuando los átomos que forman parte de la misma son monoisotópicos o cuando solamente tienen dos isótopos estables, ya que en este caso se considera que presentan un comportamiento binomial y sus abundancias se pueden obtener a partir de la probabilidad de encontrar cada uno de los isótopos en la molécula (abundancias isotópicas), combinándolas según las propiedades de una distribución binomial. Esto ocurre para algunos de los elementos que suelen formar parte de la mayoría de las moléculas orgánicas (C, H, N, Br, Cl). Sin embargo, los cálculos se complican cuando se incorporan a la molécula otros elementos tan frecuentes como O o S con más de dos isótopos estables, por lo que suele ser necesario recurrir a programas computacionales de cálculo basados en algoritmos que faciliten la tarea de calcular los perfiles isotópicos de todo tipo de moléculas.

En este trabajo, el cálculo de los perfiles isotópicos teóricos utilizados para el cálculo de las concentraciones mediante IDA molecular por IPD se llevó a cabo mediante un programa computacional basado en un procedimiento de cálculo cíclico que se inicia combinando las abundancias de dos elementos que formen parte de la molécula o el fragmento molecular de interés, de forma que se obtienen los resultados de abundancias para cada masa nominal resultante. Así, se van incorporando sucesivamente cada uno de los átomos que forman parte de la molécula hasta obtener las abundancias finales correspondientes a las masas nominales de la misma. En la *Figura 23* se muestra un ejemplo del procedimiento de cálculo en el que se basa el programa desarrollado, aplicado a la obtención de las abundancias teóricas de la molécula de metano.

1) Combinación de C y H

m/z	Combinaciones	Abundancias
13	$^{12}\text{C}^1\text{H} \rightarrow [\text{CH}]_{13}$	0,989186
14	$^{13}\text{C}^1\text{H} + ^{12}\text{C}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}]_{14}$	0,010813
15	$^{13}\text{C}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}]_{15}$	0,000001

2) Combinación de CH y H

m/z	Combinaciones	Abundancias
14	$[\text{CH}]_{13}^1\text{H} \rightarrow [\text{CH}_2]_{14}$	0,989072
15	$[\text{CH}]_{14}^1\text{H} + [\text{CH}]_{13}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}_2]_{15}$	0,010925
16	$[\text{CH}]_{15}^1\text{H} + [\text{CH}]_{14}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}_2]_{16}$	0,000002
17	$[\text{CH}]_{15}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}_2]_{17}$	0,000000

3) Combinación de CH₂ y H

m/z	Combinaciones	Abundancias
15	$[\text{CH}_2]_{14}^1\text{H} \rightarrow [\text{CH}_3]_{15}$	0,988959
16	$[\text{CH}_2]_{15}^1\text{H} + [\text{CH}_2]_{14}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}_3]_{16}$	0,011038
17	$[\text{CH}_2]_{16}^1\text{H} + [\text{CH}_2]_{15}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}_3]_{17}$	0,000004
18	$[\text{CH}_2]_{17}^1\text{H} + [\text{CH}_2]_{16}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}_3]_{18}$	0,000000
19	$[\text{CH}_2]_{18}^1\text{H} \rightarrow [\text{CH}_3]_{19}$	0,000000

4) Combinación de CH₃ y H

m/z	Combinaciones	Abundancias
16	$[\text{CH}_3]_{15}^1\text{H} \rightarrow [\text{CH}_4]_{16}$	0,988845
17	$[\text{CH}_3]_{16}^1\text{H} + [\text{CH}_3]_{15}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}_4]_{17}$	0,011150
18	$[\text{CH}_3]_{17}^1\text{H} + [\text{CH}_3]_{16}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}_4]_{18}$	0,000005
19	$[\text{CH}_3]_{18}^1\text{H} + [\text{CH}_3]_{17}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}_4]_{19}$	0,000000
20	$[\text{CH}_3]_{19}^1\text{H} + [\text{CH}_3]_{18}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}_4]_{20}$	0,000000
21	$[\text{CH}_3]_{19}^2\text{H} \rightarrow [\text{CH}_4]_{21}$	0,000000

Figura 23. Procedimiento de cálculo empleado para la obtención del perfil isotópico teórico de la molécula de metano

A partir de este procedimiento de cálculo se desarrolló un programa de *Visual Basic* escrito como macro para *Excel*, basado en el algoritmo descrito por Kubinyi.³² El programa desarrollado permite calcular con gran rapidez y de forma automática los perfiles isotópicos de gran multitud de moléculas. La *Figura 24* muestra la serie de instrucciones necesarias para el funcionamiento de este programa. Sin embargo este algoritmo presenta dos diferencias con respecto al desarrollado por Kubinyi. En primer lugar, el algoritmo de Kubinyi establece un umbral de corte sobre los valores de las abundancias calculadas para facilitar y agilizar los cálculos, de modo que, todas aquellas abundancias con valores inferiores a 0,000001 se consideran despreciables y no se consideran en posteriores combinaciones de abundancias. En el algoritmo mostrado en la *Figura 24* no se establece ningún umbral de corte de modo que se obtiene el perfil isotópico completo, evitándose así los errores derivados del redondeo. La segunda de las diferencias es que, al contrario que ocurre con el modelo de Kubinyi, con el algoritmo utilizado en este trabajo no se lleva a cabo la normalización de los perfiles isotópicos con respecto a la masa más abundante, por lo que la suma total de todas las abundancias que conforman un perfil isotópico será siempre igual a la unidad.

```

Sub CalDistIsot()
Dim Cpatt(2000): Dim c(18) As Integer: Dim Npeak(18) As Integer: Dim
Abund(18, 10): Dim D(2000)
Rem Read data from worksheets "calculation" and "database"
Natom = 18
For i = 1 To Natom: c(i) = Worksheets("calculation").Range("B" & 6 + i).Value:
Next i
For i = 1 To Natom: Npeak(i) = Worksheets("calculation").Range("C" & 6 +
i).Value: Next i
Count = 1
For i = 1 To Natom
  For j = 1 To Npeak(i)
    Count = Count + 1
    Abund(i, j) = Worksheets("database").Range("C" & 4 + Count).Value
  Next j
Next i
Cpatt(1) = 1
Rem Calculation of the mass isotopomer distribution
P = 1
Q = 1
For j = 1 To Natom
  For i = 1 To c(j)
    For k = 1 To 2000: D(k) = 0: Next k
    For k = P To Q
      For l = 1 To Npeak(j)
        D(k + l - 1) = D(k + l - 1) + Cpatt(k) * Abund(j, l)
      Next l
    Next k
    Q = Q + Npeak(j) - 1
    For k = 1 To 2000: Cpatt(k) = 0: Next k
    For k = P To Q
      Cpatt(k) = D(k)
    Next k
  Next i
Rem Write isotopomer mass distribution into worksheet "calculation"
For i = 1 To 20
  Worksheets("calculation").Range("E" & i + 1) = Cpatt(i)
Next i
Next j
End Sub

```

Figura 24. Macro de visual Basic para Excel desarrollado para el cálculo de perfiles isotópicos teóricos

El archivo de *Excel* que se utiliza para los cálculos debe constar de una base de datos en la que se incluyen los datos de la composición isotópica de los elementos naturales,³³ o enriquecidos isotópicamente, así como las masas exactas de cada uno de los isótopos de cada elemento.³⁴ Estos datos son leídos por el programa de *Visual Basic*, junto con el número de átomos de cada elemento que contiene la molécula, para realizar los cálculos que proporcionan los valores de abundancias para las 20 primeras masas consecutivas de la molécula o fragmento de interés. En la *Figura 25* se puede ver el aspecto que presenta la hoja de cálculo de trabajo.

(a)

	A	B	C	D	E
1	Isotope Distribution Calculator				
2	Isotope Composition of the Elements, 2001. J. Phys. Chem. Ref. Data, 34(2005)57-67.				
3	Database		Natural and enriched abundances		
4					
5	Isotope	Exact Mass	Abundance		
6	1H	1,007825	0,999885		
7	2H	2,014102	0,000115		
8	10B	10,012938	0,199		
9	11B	11,009305	0,801		
10	12C	12,000000	0,9893		
11	13C	13,003355	0,0107		
12	14N	14,003074	0,99636		
13	15N	15,000109	0,00364		
14	16O	15,994915	0,99757		
15	17O	16,999131	0,00038		
16	18O	17,999159	0,00205		
17	19F	18,998403	1,0000		
18	79Br*	78,918336	0,0047		
19	80Br*	80	0,0000		
20	81Br*	80,91629	0,9953		
21	31P	30,973763	1,0000		
22	32S	31,972072	0,9499		
23	33S	32,971459	0,0075		
24	34S	33,967868	0,0425		
25	35S	35	0,0000		
26	36S	35,967079	0,0001		
27	35Cl	34,968853	0,7576		
28	36Cl	36	0,0000		
29	37Cl	36,965903	0,2424		

(b)

	A	B	D	E
1	Isotope Distribution Calculator		Exact Mass	Absolute Abundance
2			16,0	0,988845
3	Lowest nominal mass	16	17,0	0,011150
4	Name of the molecule	Metano	18,0	0,000005
5			19,0	0,000000
6	Element	Atoms in the molecule	20,0	0,000000
7	Hydrogen	4	21,0	0,000000
8	Boro	0	22,0	0,000000
9	Carbon	1	23,0	0,000000
10	Nitrogen	0	24,0	0,000000
11	Oxygen	0	25,0	0,000000
12	Fluorine	0	26,0	0,000000
13	Enriched bromine	0	27,0	0,000000
14	Phosphorus	0	28,0	0,000000
15	Sulfur	0	29,0	0,000000
16	Chlorine	0	30,0	0,000000
17	Bromine	0	31,0	0,000000
18	Selenium	0	32,0	0,000000
19	Iodine	0	33,0	0,000000
20	Enriched carbon	0	34,0	0,000000
21	Enriched sulfur	0	35,0	0,000000
22	Enriched chlorine	0		
23	Enriched bromine	0	Calculate	Clear
24	Enriched selenium	0		
25				

Figura 25. Hoja de cálculo utilizada para el cálculo de perfiles isotópicos teóricos

(a) Base de datos, (b) Cálculo de abundancias isotópicas teóricas

Inicialmente este programa de cálculo se preparó para el cálculo de distribuciones isotópicas en moléculas constituidas por un máximo de 18 elementos diferentes (entre

naturales y marcados) y, para simplificar los cálculos, la distribución isotópica puede ser calculada para un número máximo de 2000 masas consecutivas, aunque estos valores pueden ser fácilmente modificados en el macro de *Excel* si fuera necesario.

El programa de cálculo inicia su funcionamiento leyendo los datos del número de átomos de cada tipo en la molécula (columna B en (b)) así como las abundancias de cada uno de los isótopos de ese elemento (en (a)). Cabe destacar que, puesto que los resultados de abundancias isotópicas se obtienen para una serie de masas consecutivas que se diferencian en una unidad, para aquellos elementos cuyos isótopos no presentan masas consecutivas fue necesario incluir formas de ese elemento que no existen realmente, por lo que se les dio valor de abundancia 0,0000 con el fin de evitar los saltos en los bucles diseñados para llevar a cabo la combinación de abundancias. En la *Figura 25 (a)* se puede ver un ejemplo para el Br, que es un elemento que tiene dos isótopos con m/z no consecutivos (79 y 81), por lo que en la base de datos se incluyó un tercer isótopo, ^{80}Br , con abundancia 0 para el cálculo de los perfiles isotópicos.

Finalmente, el uso de este programa de cálculo resulta tan sencillo como introducir el número de átomos de cada tipo que contiene la molécula o fragmento de interés (en la zona sombreada en gris en (b)) y pulsar el botón *Calculate*.

Determinación de compuestos orgánicos mediante IDA molecular con fuente de EI

Como se ha mencionado en la introducción, la determinación de contaminantes orgánicos halogenados volátiles y semivolátiles se ha llevado a cabo mayoritariamente mediante la técnica de GC-MS, empleando en un buen número de ocasiones la fuente de EI como sistema de ionización. Cuando además se pretende llevar a cabo la cuantificación mediante la metodología de IDA molecular por IPD se debe tener en cuenta que la distribución isotópica medida experimentalmente para las sustancias natural y marcada se pueden diferenciar ligeramente de los valores calculados teóricamente. La diferencia observada entre ambos puede deberse, por un lado, a un efecto que ocurre con frecuencia cuando se trabaja con la fuente de EI, que consiste en la posible pérdida o captación de átomos de H para la formación de iones MH_n^+ o $M-nH^+$ ($n = 1, \dots, 4$), que ayudan a estabilizar al ión mayoritario M^+ de cada fragmento generado en la fuente.²⁷ Por otro lado, también puede explicarse teniendo en cuenta la anchura de los perfiles de los picos espectrales derivada la baja resolución que ofrece el analizador de tipo cuadrupolo, que puede dar lugar a contribuciones sobre la señal

medida a las masas nominales una unidad inferior y/o superior a la del ion mayoritario.

Por tanto, la pureza del fragmento molecular sobre el que se van a realizar las medidas de las abundancias isotópicas debe ser evaluada con detalle, tanto para el compuesto natural como para su análogo marcado isotópicamente, con el fin de poder asegurar la calidad de los resultados analíticos proporcionados por la metodología de IDA molecular. El estudio de la pureza de un ión molecular se puede llevar a cabo mediante la aplicación del procedimiento matemático de IPD.²⁷ Para ello se debe considerar que en la fuente se produce una mezcla de distintas especies del fragmento de interés (M^+ , MH_n^+ y/o $M-nH^+$) de forma que la señal obtenida experimentalmente se puede expresar como una combinación lineal de los perfiles calculados teóricamente para el fragmento puro (M^+) y para todos aquellos fragmentos generados en la fuente por la pérdida o ganancia de átomos de H (MH_n^+ o $M-nH^+$). Si se considera que se produce una situación análoga a la que tiene lugar en una mezcla de las formas natural y marcada de una sustancia de interés la Ecuación 28 se puede reescribir obteniéndose la Ecuación 34.

$$\begin{bmatrix} A_{exp}^1 \\ A_{exp}^2 \\ A_{exp}^3 \\ \dots \\ A_{exp}^{n-1} \\ A_{exp}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{M^+}^1 & A_{M+1^+}^1 & A_{M-1^+}^1 & A_{M+2^+}^1 & A_{M-2^+}^1 & \dots \\ A_{M^+}^2 & A_{M+1^+}^2 & A_{M-1^+}^2 & A_{M+2^+}^2 & A_{M-2^+}^2 & \dots \\ A_{M^+}^3 & A_{M+1^+}^3 & A_{M-1^+}^3 & A_{M+2^+}^3 & A_{M-2^+}^3 & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ A_{M^+}^{n-1} & A_{M+1^+}^{n-1} & A_{M-1^+}^{n-1} & A_{M+2^+}^{n-1} & A_{M-2^+}^{n-1} & \dots \\ A_{M^+}^n & A_{M+1^+}^n & A_{M-1^+}^n & A_{M+2^+}^n & A_{M-2^+}^n & \dots \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \alpha_{M^+} \\ \alpha_{M+1^+} \\ \alpha_{M-1^+} \\ \alpha_{M+2^+} \\ \alpha_{M-2^+} \\ \dots \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad \text{(Ecuación 34)}$$

Siendo a el factor de fragmentación para cada una de las posibles formas del fragmento en estudio generadas en la fuente. Una vez determinados los valores de cada a se pueden recalcular las abundancias isotópicas de trabajo para el compuesto, bien sea natural o marcado, mediante la Ecuación 35.

$$A_{est}^i = \alpha_{M^+} A_{M^+}^i + \alpha_{M+1^+} A_{M+1^+}^i + \alpha_{M-1^+} A_{M-1^+}^i + \dots \quad \text{(Ecuación 35)}$$

Siendo A_{est}^i las nuevas abundancias isotópicas estimadas para la masa nominal i ($i = 1, \dots, n$) del fragmento de trabajo. A partir de las abundancias isotópicas estimadas se construirá un nuevo perfil isotópico del analito en su forma natural y marcada, que serán los perfiles que serán finalmente empleados en la matriz de abundancias (A_S^i y A_{Sp}^i) de la Ecuación 28 para los cálculos de IDA por IPD para la determinación de

compuestos orgánicos. Idealmente, para que esta metodología de cálculo sea aplicable de forma general a la cuantificación mediante IDA es deseable que los factores de fragmentación sean independientes de la composición isotópica, de las condiciones de ionización en la fuente de iones y de la concentración del compuesto inyectada en el sistema cromatográfico. En aquellos casos en los que no se cumplan estas condiciones resulta imprescindible determinar los factores de fragmentación para las condiciones concretas de trabajo (enriquecimiento del trazador, niveles de concentración de analito y trazador en la mezcla y condiciones del sistema GC-(EI)MS) empleadas en cada caso.

Determinación de PBDEs mediante IDA molecular por IPD

Los perfiles isotópicos experimentales de los PBDEs se obtuvieron inyectando una mezcla de patrones naturales o marcados en el sistema GC-(EI)MS. En concreto se utilizaron mezclas de patrones naturales de varios congéneres (desde tri- hasta hexabromados) a un nivel de concentración de $1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ así como una disolución diluida de la mezcla de patrones marcados en ^{81}Br obtenidos en la reacción de síntesis descrita en la sección C.3.1.2 y un patrón marcado en ^{13}C a un nivel de concentración de $1\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, obteniéndose sus correspondientes espectros de masas en el modo de trabajo de barrido. Para los PBDEs el espectro de masas presenta dos clústers principales correspondientes al ion molecular (M^+) y al generado por la pérdida de dos átomos de Br ($M-2\text{Br}^+$), con intensidades relativas dependientes del grado de bromación de la molécula,³⁵ por lo que ambos fueron seleccionados como objeto de estudio en este trabajo. Para el estudio de los factores de fragmentación se seleccionaron ventanas de masas incluyendo las diez masas consecutivas más abundantes para cada clúster (*Tabla 35*).

Tabla 35. *Condiciones de medida seleccionadas para el estudio de los factores de fragmentación de los PBDEs*

Número de átomos de Br	Ventana de masas	
	Clúster M+	Clúster M-2Br+
3	402,8 – 411,8	243,0 – 252,0
4	481,7 – 490,7	321,9 – 330,9
5	561,6 – 570,6	401,8 – 410,8
6	643,5 – 652,5	480,7 – 489,7

Los valores de abundancias isotópicas experimentales fueron obtenidos dividiendo el área de pico obtenida para cada masa nominal entre la suma total de áreas obtenidas para todas las masas nominales medidas en cada clúster mientras que los perfiles isotópicos teóricos fueron obtenidos a través del programa de cálculo descrito en la sección anterior. Para el cálculo de los factores de fragmentación se aplicó la técnica de IPD según la *Ecuación 34*, incluyéndose en la misma los perfiles isotópicos teóricos correspondientes a las especies M^+ , $M-1^+$, $M+1^+$, $M-2^+$ y $M+2^+$. Los factores de fragmentación fueron evaluados para distintas condiciones de la fuente de ionización y para diferentes días de trabajo. En la *Figura 26* se muestra, a modo de ejemplo, la diferencia observada entre los perfiles isotópicos teóricos y experimentales para el compuesto BDE-28 con abundancias isotópicas naturales.

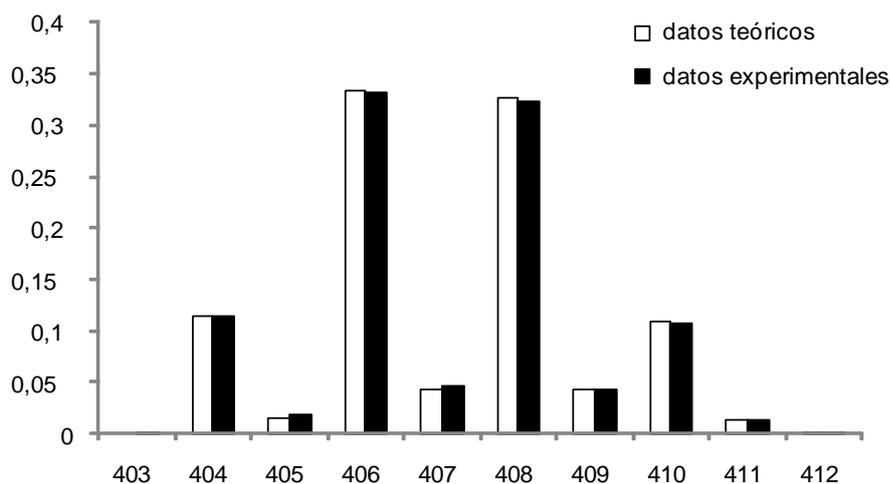


Figura 26. Comparación de perfiles isotópicos teórico y experimental para BDE-28 ($C_{12}H_7OBr_3$)

Para definir la causa (baja resolución del analizador de masas o pérdida y/o ganancia de átomos de H) de las diferencias observadas entre los perfiles teórico y experimental de los PBDEs se estudió el comportamiento de la perfluorotributilamina (PFTBA), sustancia comúnmente utilizada para la calibración de masas en los sistemas GC-(EI)MS. Para ello se midieron las de la señales de los principales clústers de la PFTBA (69, 131, 219, 414 y 502), que al tratarse de una molécula perfluorada solamente podrá contribuir a las masas nominales $M-1^+$ o $M+1^+$ debido al ensanchamiento de los picos causado por la baja resolución del analizador de masas.

Finalmente, en la *Tabla 36* se resumen las condiciones de trabajo utilizadas para la determinación de PBDEs en muestras de pescado mediante IDA molecular, utilizando un sistema de GC-(EI)MS y realizando los cálculos mediante IPD.

Tabla 36. Condiciones de trabajo del sistema GC-(EI)MS para su aplicación a IDA molecular

Parámetros de GC e interfase	
Columna	DB-5MS UI (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm)
Modo de inyección	Sin división de flujo (2 min) con pulso de presión
Pulso de presión	30 psi, 1,5 min
Volumen inyectado	2 μL
Gas portador / presión en el inyector	He / 2 mL·min ⁻¹ (flujo constante)
Temperatura de inyección	290 °C
Temperatura de la interfase	280 °C
Programa de temperaturas del horno	90 °C (2 min) hasta 200 °C (10 min) a 30 °C min ⁻¹ y hasta 300°C (10 min) a 30°C
Parámetros de (EI)MS	
Temperatura de la fuente	230 °C
Modo de adquisición	SIM
Isótopos detectados	Clúster M ⁺ (ver <i>Tabla 35</i>)
Tiempo de integración	20 ms
Ventana del disolvente	3,5 min

C.3.2.3 Cálculo de incertidumbres

Los valores de concentración de los PBDEs obtenidos para las muestras analizadas en este trabajo fueron siempre acompañados por su correspondiente valor de incertidumbre. Para el cálculo de la incertidumbre asociada a cada medida se utilizó el método de Kragten,³⁶ que es un método numérico universal que permite, mediante una sencilla hoja de cálculo, la estimación de la incertidumbre combinada de un resultado a partir de la expresión empleada para el cálculo de dicho resultado (incluyendo los factores de corrección necesarios) y los valores de los parámetros implicados junto con sus incertidumbres.

La expresión de la incertidumbre de un resultado que depende de una serie de parámetros x_1, x_2, \dots, x_n viene dada, de forma general, por la *Ecuación 36*.

$$u(y(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n)) = \sqrt{\sum_{i=1, \dots, n} \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} u(x_i) \right)^2 + \sum_{i, k=1, \dots, n} \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \frac{\partial y}{\partial x_k} u(x_i, x_k) \right)} \quad \text{(Ecuación 36)}$$

En los casos en los que $y(x_1, x_2, \dots, x_n)$ es lineal en x_i o cuando $u(x_i)$ es pequeño en comparación con x_i , se puede tomar la aproximación mostrada en la *Ecuación 37*.

$$\frac{\partial y}{\partial x_i} \approx \frac{y(x_i + u(x_i)) - y(x_i)}{u(x_i)} \quad \text{(Ecuación 37)}$$

Multiplicando por $u(x_i)$ para obtener la incertidumbre en y debida a la incertidumbre en x_i , $u(y, x_i)$ se obtiene la *Ecuación 38*.

$$u(y, x_i) \approx y(x_1, x_2, \dots, (x_i + u(x_i)), \dots, x_n) - y(x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n) \quad \text{(Ecuación 38)}$$

Por lo que $u(y, x_i)$ es la diferencia de los valores de y calculados para $[x_i + u(x_i)]$ y x_i , respectivamente.

La construcción de una hoja de cálculo se muestra en la *Figura 27* para el caso de un resultado que es función de cuatro parámetros p , q , r y s . En el primer paso (*Figura 27 (a)*) se disponen en columna los valores de los cuatro parámetros así como la fórmula para el cálculo del resultado a partir de los valores de dichos parámetros. Además en la primera fila de cada columna se introduce la incertidumbre de cada uno de los parámetros $u(p)$, $u(q)$, etc. A continuación, cada incertidumbre se añade al valor de su variable correspondiente en esa columna (diagonal de la matriz), como se muestra en la *Figura 27 (b)*, de modo que el valor de resultado y en esa columna se ve alterado. Así, para el caso de p , el valor de la incertidumbre en y debido a la incertidumbre en dicho parámetro ($u(y, p)$) se obtiene de la *Ecuación 39*.

$$u(y, p) = f(p + u(p), q, r, \dots) - f(p, q, r, \dots) \quad \text{(Ecuación 39)}$$

Finalmente, la incertidumbre estándar de y se obtiene como la raíz cuadrada de la suma de las contribuciones individuales al cuadrado como se indica en la *Figura 27 (c)*. Además, esta hoja de cálculo permite evaluar con facilidad el nivel de contribución de las distintas fuentes de incertidumbre sobre el resultado y .

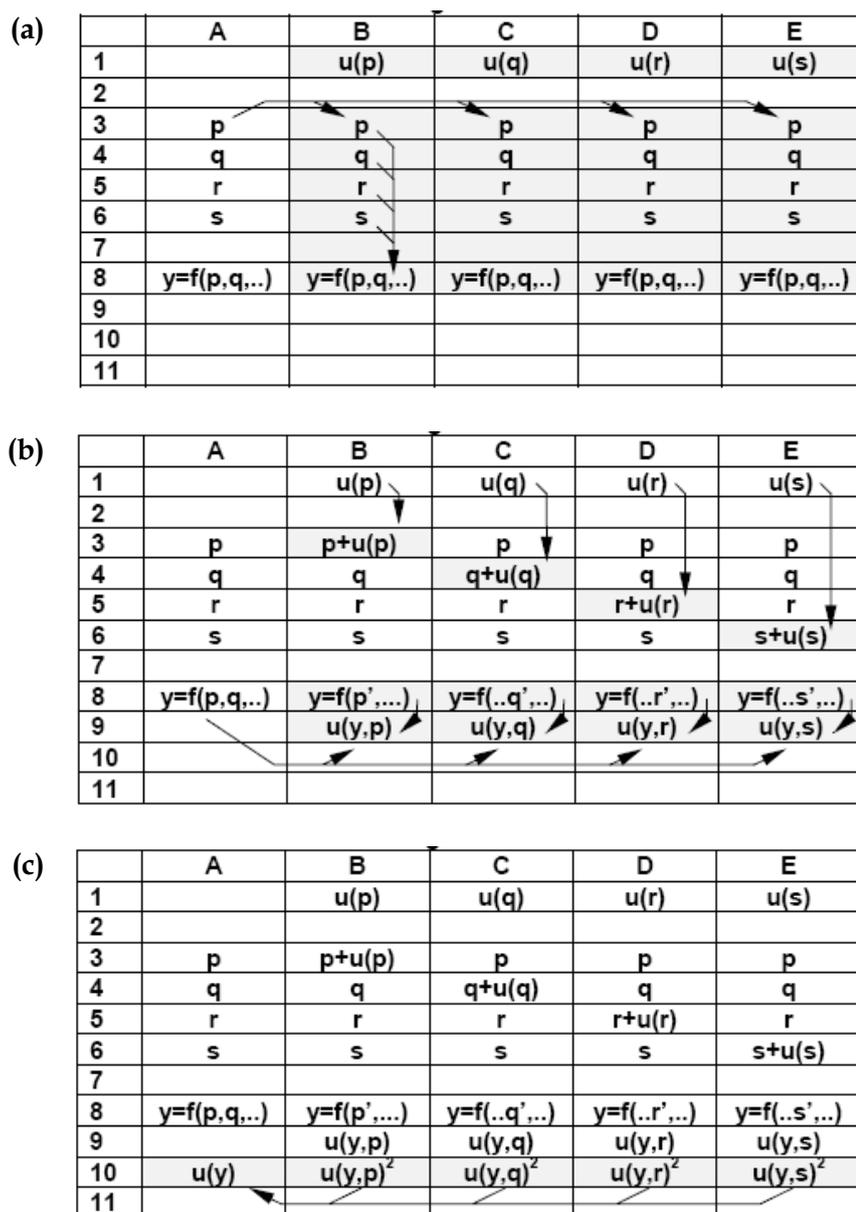


Figura 27. Hoja de cálculo modelo para realizar el cálculo de propagación de incertidumbres según Kragten³⁷

Para el cálculo de las incertidumbres asociadas a los valores de concentración obtenidos para los PBDEs en muestras biológicas y medioambientales se preparó una hoja de cálculo como la de la *Figura 27*, en la que p, q, \dots son los parámetros que aparecen en la *Ecuación 13*, cuando la cuantificación se lleva a cabo a través de IDA elemental, o en la *Ecuación 33*, cuando la cuantificación se lleva a cabo mediante IDA molecular por IPD.

Las incertidumbres asociadas a los parámetros de la *Ecuación 13* son conocidas, ya que son constantes (m_s y m_{Sp}), están tabuladas (A_s^a) o se pueden obtener fácilmente

mediante cálculos teóricos (R_s) o a través de los valores de dispersión de los datos obtenidos experimentalmente (R_m). Los datos relativos al trazador serán proporcionados por el proveedor y en aquellos casos en los que se haya obtenido mediante síntesis deberán ser certificados en concentración y abundancias mediante IDA inversa con un patrón natural de concentración y abundancias certificadas. De este modo, la incertidumbre en las abundancias (A_{sp}) del trazador podrá ser calculada a través de los valores de dispersión obtenidos experimentalmente y la incertidumbre en la concentración (C_{sp}) se obtendrá igualmente aplicando el método de Kragten a la ecuación de IDA inversa.

Sin embargo, cuando se pretende llevar a cabo la cuantificación mediante IDA molecular por IPD, R_m no se obtiene directamente a través de las medidas experimentales (abundancias isotópicas en la mezcla) como ocurre en el caso de IDA elemental, sino que es necesario realizar un cálculo de regresión lineal multivariable para obtener las fracciones molares del compuesto natural y el marcado que finalmente proporcionarán el valor de R_m . Por tanto, a la hora de calcular la incertidumbre asociada a la concentración obtenida mediante la *Ecuación 33* habrá algunas fuentes de incertidumbre del tipo de las que aparecen en IDA elemental (m_s , m_{sp} , PM_s , etc.), que podrán ser calculadas fácilmente de forma análoga a la empleada en IDA elemental. Sin embargo, el cálculo de la incertidumbre asociada a R_m requerirá la combinación de las incertidumbres asociadas a cada uno de los parámetros implicados en el cálculo de R_m . Teniendo en cuenta la *Ecuación 28*, las fracciones molares de analito y el trazador dependen de los valores de abundancias en la mezcla, obtenidos experimentalmente, y de las abundancias del compuesto puro natural y marcado, obtenidas mediante el programa de cálculo para la obtención de perfiles isotópicos descrito en la sección C.3.2.2.2, corregidas por sus correspondientes factores de fragmentación, obtenidos a su vez a través de una regresión lineal multivariable.

C.3.2.3.1 Incertidumbre derivada del cálculo de la regresión lineal multivariable

Como ya se ha indicado anteriormente, para aquellos casos en los que el número de ecuaciones planteadas para el cálculo de fracciones molares por IPD según la *Ecuación 28* sea superior al número de incógnitas, los grados de libertad restantes permiten calcular las incertidumbres asociadas a cada fracción molar a través de la matriz varianza-covarianza, $V(X)$, obtenida según la *Ecuación 40*.

$$V(X) = (A' \times A)^{-1} \cdot s_e^2 \quad \text{(Ecuación 40)}$$

Donde A es la matriz con las abundancias teóricas de los compuestos puros, A' es la transpuesta de la matriz A y el superíndice -1 indica la inversa de la matriz resultante del producto y s_e^2 es la varianza de la regresión (suma cuadrática de los errores dividida entre los grados de libertad, $n-2$). En la matriz varianza-covarianza los elementos de la diagonal de la matriz $V(X)$ son las varianzas de las variables X_S y de X_{Sp} . Estos datos se pueden obtener de forma más sencilla y directa mediante la función *ESTIMACIÓN.LINEAL* de *Excel* al igual que ocurre con los valores de las fracciones molares X_S y X_{Sp} (ver *Figura 22* en la sección C.3.2.2.2).

Por otro lado se debe tener en cuenta que las fracciones molares del compuesto natural y el trazador están correlacionadas, por lo que este aspecto también debe ser tenido en cuenta para el cálculo de la incertidumbre experimental asociada a R_m . En este caso la incertidumbre se deberá expresar según la *Ecuación 41*.

$$s_{RLM} = \frac{X_S}{X_{Sp}} \sqrt{\left(\frac{s_{X_S}}{X_S}\right)^2 + \left(\frac{s_{X_{Sp}}}{X_{Sp}}\right)^2 - 2\rho(X_S, X_{Sp}) \frac{s_{X_S} s_{X_{Sp}}}{X_S X_{Sp}}} \quad \text{(Ecuación 41)}$$

Donde $\rho(X_S, X_{Sp})$ es el coeficiente de correlación de las fracciones molares y s_{R_m} , s_{X_S} y $s_{X_{Sp}}$ las incertidumbres de la relación isotópica de la muestra y de las fracciones molares del compuesto natural y el trazador respectivamente.

Cuando dos parámetros se relacionan según una ecuación del tipo $X_S + X_{Sp} = 1$ ambos parámetros proporcionan la misma cantidad de información y sus incertidumbres son iguales. Se dice, en este caso, que las fracciones molares están perfectamente anticorrelacionadas³⁸ y por tanto presentan un coeficiente de correlación de -1 ,³⁹ de modo que la *Ecuación 41* se puede simplificar para obtener la *Ecuación 42*.

$$s_{RLM} = \frac{X_S}{X_{Sp}} \sqrt{\left(\frac{s_{X_S}}{X_S}\right)^2 + \left(\frac{s_{X_{Sp}}}{X_{Sp}}\right)^2 + 2 \frac{s_{X_S} s_{X_{Sp}}}{X_S X_{Sp}}} \quad \text{(Ecuación 42)}$$

De este modo se obtiene la incertidumbre asociada al cálculo de la regresión lineal multivariable, que junto con la incertidumbre asociada al cálculo teórico de las abundancias y la derivada del cálculo de los factores de fragmentación se propaga por el método de Kragten para obtener la incertidumbre asociada a la relación isotópica de la mezcla.

C.3.2.3.2 Incertidumbre asociada las abundancias isotópicas teóricas

Las incertidumbres asociadas al cálculo de las abundancias isotópicas teóricas de moléculas o fragmentos moleculares se puede obtener a partir de las incertidumbres en las abundancias de los elementos que lo forman. Cuando se trata de compuestos naturales estos datos están tabulados y dependen de las variaciones naturales de dichos elementos mientras que para elementos marcados la variabilidad en la composición isotópica del elemento en una molécula se puede obtener experimentalmente. Combinando estos datos según el método de Kragten es posible obtener la incertidumbre total asociada a la molécula o fragmento molecular de interés. La hoja de cálculo desarrollada para el cálculo de incertidumbres en las abundancias isotópicas teóricas se incluyó como un complemento en la hoja de cálculo desarrollada para el cálculo de abundancias isotópicas teóricas, incluyendo en la base de datos las incertidumbres asociadas a cada posible elemento, de forma que se pueden obtener fácilmente las incertidumbres, así como su representación gráfica sobre el perfil isotópico calculado, simplemente indicando el número de átomos de cada tipo presentes en la molécula o fragmento molecular y pulsando el botón *Calculate Uncertainties*.³⁹ La *Figura 28* muestra un ejemplo de esta hoja de cálculo. Como se puede observar los valores de incertidumbres asociados a las abundancias isotópicas teóricas para el ejemplo mostrado (BDE-100) son muy bajos y lo mismo ocurre para el resto de los grupos homólogos, por lo que esta fuente de incertidumbre se despreció frente a la derivada del cálculo de la regresión lineal multivariable.

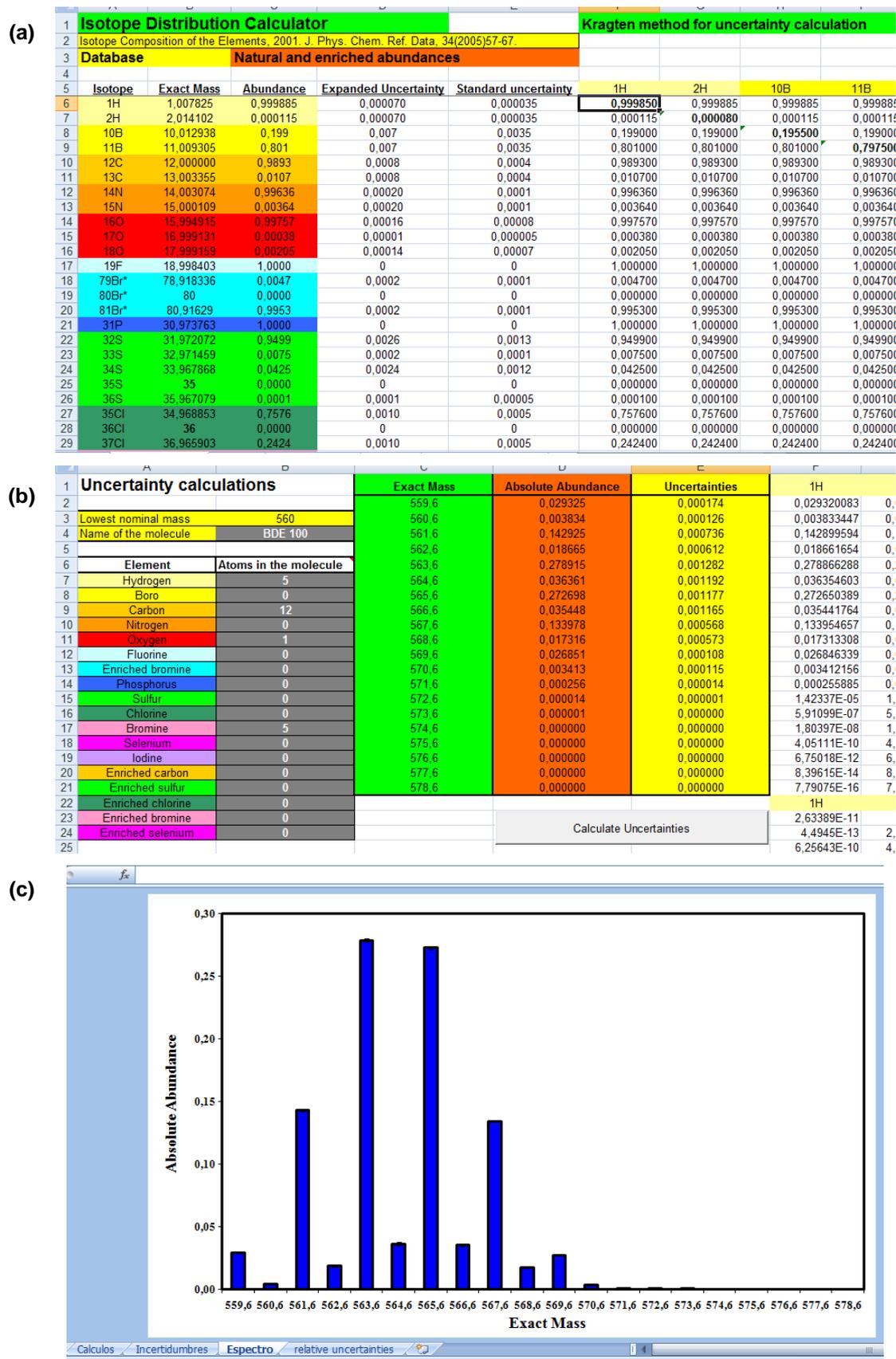


Figura 28. Hoja de cálculo para el cálculo de perfiles isotópicos teóricos y sus incertidumbres (a) Base de datos, (b) Abundancias isotópicas teóricas e incertidumbres, (c) Representación gráfica

C.3.2.3.3 Incertidumbre derivada del cálculo de los factores de fragmentación

Los factores de fragmentación se obtienen a través de una regresión lineal multivariable de igual manera que se obtienen las fracciones molares que se emplean para el cálculo de la concentración del analito en la muestra y dependerán de las abundancias teóricas y de las abundancias obtenidas experimentalmente. Como ocurre en el caso de las fracciones molares la contribución de la incertidumbre procedente del cálculo de las abundancias isotópicas teóricas es despreciable frente a la aportada por el cálculo de la regresión lineal multivariable, por lo que la incertidumbre total en los factores de fragmentación se aproxima a la obtenida a través de la matriz varianza-covarianza o mediante la función *ESTIMACION.LINEAL* de *Excel*. Como ocurre con las incertidumbres asociadas a las abundancias isotópicas teóricas, la incertidumbre aportada por los factores de fragmentación resulta despreciable frente a la procedente de los cálculos de las fracciones molares mediante regresión lineal multivariable, por lo que no fue incluida en el cálculo de la incertidumbre asociada a R_m .

C.3.2.3.4 Estudios de propagación de errores

Puesto que todos los parámetros implicados en el cálculo de R_m presentan incertidumbres despreciables frente a la introducida al realizar los cálculos de las fracciones molares mediante regresión lineal multivariable, se puede considerar que la incertidumbre en R_m viene dada por la *Ecuación 43*.

$$\frac{s_{R_m}}{R_m} = \sqrt{\left(\frac{s_{X_S}}{X_S}\right)^2 + \left(\frac{s_{X_{Sp}}}{X_{Sp}}\right)^2 + 2 \frac{s_{X_S} s_{X_{Sp}}}{X_S X_{Sp}}} \quad \text{(Ecuación 43)}$$

Teniendo en cuenta que todos los parámetros incluidos en la *Ecuación 33* excepto R_m son constantes y que también lo son sus incertidumbres asociadas, el único modo de minimizar la incertidumbre en el cálculo de concentraciones es optimizando el valor de R_m al igual que se hace cuando se llevan a cabo los cálculos mediante IDA elemental. Como ya se ha mencionado anteriormente (sección C.3.2.3.1) las incertidumbres de ambos parámetros van a ser iguales y además se cumple que $X_S + X_{Sp} = 1$, por tanto para encontrar los valores de X_S y X_{Sp} que hacen mínima la relación s_{R_m}/R_m se dieron a s_X valores fijos del orden de los obtenidos en las medidas experimentales, tomándose $s_X = 0,01$ y $0,001$ como valores extremos superior e inferior para obtener las curvas de

propagación de error. La *Figura 29* muestra las curvas obtenidas para estos valores de s_x .

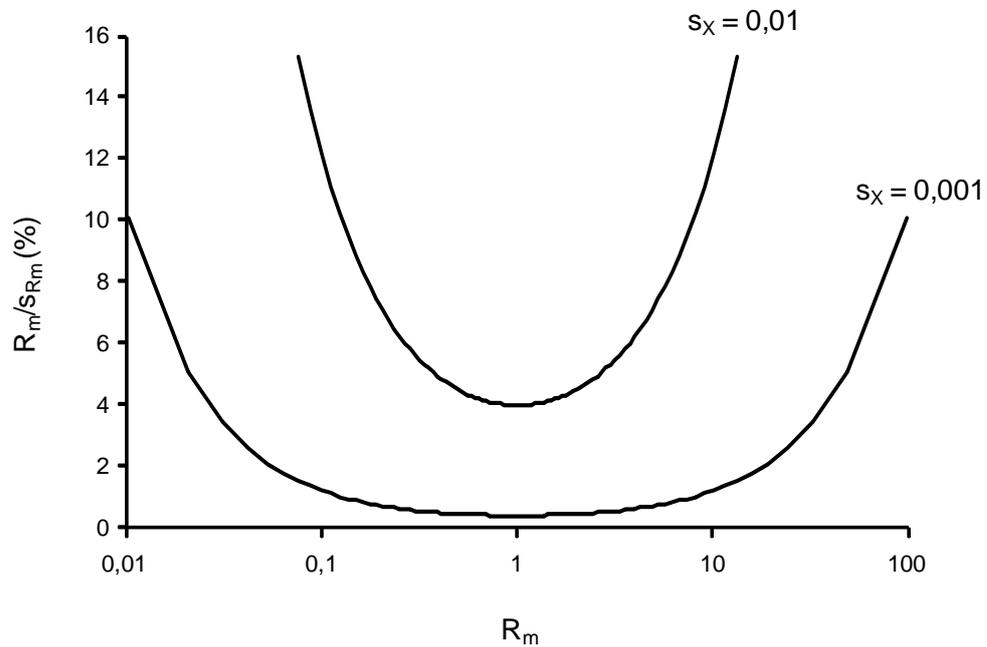


Figura 29. Curva de propagación de error en IDA molecular

Como se puede observar la incertidumbre asociada a la medida de R_m es mínima para ambos valores de s_x cuando $R_m = 1$, por lo que $X_S = X_{Sp} = 0,5$. Cabe destacar que los valores de s_x experimentales generalmente suelen tener valores próximos a $0,001$, por lo que en general se puede trabajar dentro del rango de valores de R_m que va de $0,1$ a 10 manteniendo la incertidumbre asociada a R_m en valores mínimos.

C.4 REFERENCIAS

- ¹ M. Montes Bayón, M. Gutierrez Cambor, J. I. García Alonso, A. Sanz Medel. **An alternative GC-ICP-MS interface design for trace element speciation.** *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 1999, 14(9), 1317-1322.
- ² **Patente española:** P9801923.
- ³ I. A. Leal-Granadillo, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Determination of the speciation of organolead compounds in airborne particulate matter by gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Anal. Chim. Acta*, 2000, 423, 21-29.
- ⁴ **Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council.** *Official Journal of the European Union*, 24.12.2008, 348, 84-97.
- ⁵ A. Schwarz, K. G. Heumann. **Two-dimensional on-line detection of brominated and iodinated volatile organic compounds by ECD and ICP-MS after GC separation.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 374(2), 212-219.
- ⁶ D. Pröfrock, P. Leonhard, S. Wilbur, A. Prange. **Sensitive, simultaneous determination of P, S, Cl, Br and I containing pesticides in environmental samples by GC hyphenated with collision-cell ICP- MS.** *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2004, 19, 623-631.
- ⁷ M. Edler, D. Metze, N. Jakubowski, M. Linscheid. **Quantification of silylated organic compounds using Gas Chromatography coupled to ICP-MS.** *J. Anal Atom. Spectrom.*, 2002, 17, 1209-1212.
- ⁸ J. D. Fassett, P. J. Paulsen. **Isotope-Dilution Mass-Spectrometry for accurate elemental analysis.** *Anal. Chem.*, 1989, 61, 623A-644A.
- ⁹ K. E. Murphy, S. E. Long, R. D. Vocke. **On the certification of cadmium at trace and ultratrace levels in standard reference materials using ID ICP-MS.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387, 2453-2461.

- ¹⁰ O. Y. Ghidan, R. D. Loss. **Isotope fractionation and concentration measurements of Zn in meteorites determined by the double spike, IDMS-TIMS techniques.** *Meteorit. Planet. Sci.*, 46, 830–842.
- ¹¹ K. G. Heumann. **Isotope-dilution ICP-MS for trace element determination and speciation: from a reference method to a routine method?** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 378, 318–329.
- ¹² J. Heilmann, K. G. Heumann. **Development of a species-unspecific Isotope Dilution GC-ICPMS method for possible routine quantification of sulfur species in petroleum products.** *Anal. Chem.*, 2008, 80, 1952-1961.
- ¹³ S. Clémens, M. Monperrus, O. F. X. Donard, D. Amouroux, T. Guérin. **Mercury speciation analysis in seafood by species-specific isotope dilution: method validation and occurrence data.** *Anal Bioanal Chem.*, 2011, 401, 2699-2711.
- ¹⁴ K. G. Heumann. **Isotope dilution mass spectrometry.** *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, 1992, 118/119, 575–592.
- ¹⁵ P. Rodríguez-González, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review.** *Spectrochim. Acta B*, 2005, 60, 151-207.
- ¹⁶ Giese, R. W. **Electron-capture mass spectrometry: recent advances.** *J. Chromatogr. A*. 2000, 892, 329-346.
- ¹⁷ J. I. García Alonso. **Determination of fission products and actinides by inductively coupled plasma-mass spectrometry using isotope dilution analysis: A study of random and systematic errors.** *Anal. Chim. Acta*, 1995, 312, 57-78.
- ¹⁸ J. Wieling. **LC-MS-MS experiences with internal standards.** *Chromatographia*, 2002, 55, Supl. S107-S113
- ¹⁹ L. K. Ackerman, G. R. Wilson, S. L. Simonich. **Quantitative analysis of 39 polybrominated diphenyl ethers by isotope dilution GC/low-resolution MS.** *Anal. Chem.* 2005, 77, 1979-1987.
- ²⁰ S. Asam, K. Konitzer, P. Schieberle, M. Rychlik. **Stable isotope dilution assays of alternariol and alternariol monomethyl ether in beverages.** *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 5152–5160.

- ²¹ N. Poperechna, K. G. Heumann. **Simultaneous multi-species determination of trimethyllead, monomethylmercury and three butyltin compounds by species-specific isotope dilution GC-ICP-MS in biological samples.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 383, 153–159.
- ²² P. Pinel-Raffaitin, P. Rodríguez-González, M. Ponthieu, D. Amouroux, I. Le Hecho, L. Mazeas, O. F. X. Donard, M. Potin-Gautier. **Determination of alkylated tin compounds in landfill leachates using isotopically enriched tin species with GC-ICP-MS detection.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, 22, 258–266.
- ²³ G. Centineo, E. Blanco González, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Isotope dilution SPME GC/MS for the determination of methylmercury in tuna fish samples.** *J. Mass Spectrom.*, 2006, 41, 77–83.
- ²⁴ G. Centineo, P. Rodríguez-González, E. Blanco González, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel, N. Font Cardona, J. L. Aranda Mares, S. Ballester Nebot. **Isotope dilution GC-MS routine method for the determination of butyltin compounds in water.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 384, 908–914.
- ²⁵ A. Castillo, P. Rodríguez-González, G. Centineo, A. F. Roig-Navarro, J. I. García Alonso. **Multiple spiking Species-Specific Isotope Dilution Analysis by molecular Mass Spectrometry: Simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues.** *Anal. Chem.*, 2010, 82, 2773–2783.
- ²⁶ J. Meija, J.A. Caruso. **Deconvolution of isobaric interferences in Mass Spectra.** *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2004, 15, 654–658.
- ²⁷ J. Meija, G. Centineo, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel, J. Caruso. **Interpretation of butyltin mass spectra using isotope pattern reconstruction for the accurate measurement of isotope ratios from molecular clusters.** *J. Mass Spectrom.*, 2005, 40, 807–814.
- ²⁸ J.A. Rodríguez-Castrillón, M. Moldovan, J. I. García Alonso, J.J. Lucena, L. Hernández-Apaolaza. **Isotope Pattern Deconvolution as a tool to study iron metabolism in plants.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 390, 579–590.
- ²⁹ P. Rodríguez-González, A. Rodríguez-Cea, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Species-Specific Isotope Dilution Analysis and Isotope Pattern Deconvolution for butyltin compounds metabolism investigations.** *Anal. Chem.*, 2005, 77, 7724–7734.

- ³⁰ A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J. Ignacio García Alonso. **Evaluation of minimal ¹³C-labelling for stable isotope dilution in organic analysis.** *Analyst*, 2010, 135 (5), 953-964.
- ³¹ H. González Iglesias, M. L. Fernández Sánchez, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Use of enriched ⁷⁴Se and ⁷⁷Se in combination with isotope pattern deconvolution to differentiate and determine endogenous and supplemented selenium in lactating rats.** *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 389, 707-713.
- ³² H. Kubinyi. **Calculation of isotope distributions in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problem.** *Anal. Chim. Acta*, 1991, 247, 107.
- ³³ J. K. Böhlke, J. R. de Laeter, P. De Bièvre, H. Hidaka, H. S. Peiser, K. J. R. Rosman, P. D. P. Taylor. **Isotopic compositions of the elements, 2001.** *J. Phys. Chem. Ref. Data.*, 2005, 34, 57.
- ³⁴ G. Audi, A. H. Wapstra. **The 1995 update to the atomic mass evaluation.** *Nucl. Phys. A*, 1995, 595, 409.
- ³⁵ A. Covaci, S. Voorspoels, L. Ramos, H. Neels, R. Blust. **Recent developments in the analysis of brominated flame retardants and brominated natural compounds.** *J. Chromatogr. A*, 2007, 1153, 145-171.
- ³⁶ J. Kragten. **Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique.** *Analyst*, 1994, 119, 2161-2165.
- ³⁷ **Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement**, Eurachem / CITAC Guide, Eds. S. L. R. Ellison, M. Rosslein, A. Williams, Second Edition, 2000.
- ³⁸ J. Meija, Z. Mester. **Atomic weight uncertainty calculation from isotopic composition of the elements.** *Metrologia*, 2008, 45, 459-463.
- ³⁹ J. I. García Alonso, P. Rodríguez-González, A. González-Gago, A. González-Antuña. **Determination of the uncertainties in the theoretical mass isotopomer distribution of molecules.** *Anal. Chim. Acta*, 2010, 664, 68-76.

D. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

D.1 DETERMINACIÓN DE TRIHALOMETANOS EN AGUAS DE CONSUMO HUMANO

Artículo científico I. Adriana González-Gago, Juan Manuel Marchante-Gayón,
José Ignacio García Alonso

Determination of trihalomethanes in drinking water by GC-ICP-MS using
compound independent calibration with internal standard

J. Anal. At. Spectrom., 2007, 22, 1138-1144

D.1.1 Introducción

Los THMs son los principales subproductos de desinfección generados en el proceso de cloración de las aguas destinadas al consumo humano como consecuencia de la reacción del cloro con la materia orgánica presente en las aguas naturales. Según ciertos estudios toxicológicos estas sustancias pueden provocar importantes efectos adversos sobre los seres vivos expuestos, por lo que su contenido máximo debe ser regulado y controlado para proteger la salud de la población y garantizar su bienestar.

Como consecuencia, todos aquellos laboratorios dedicados al control medioambiental tendrán que analizar un gran número de muestras recogidas en distintos puntos situados a lo largo de la red de abastecimiento de aguas para asegurar que no se excedan los niveles fijados por la legislación. Resulta por tanto de gran utilidad el desarrollo de nuevos métodos de análisis que permitan controlar de una forma sencilla rápida y fiable el nivel de THMs en aguas.

En este sentido, la detección de THMs mediante (ICP)MS tras su separación por GC ofrece importantes ventajas frente a otras técnicas de detección debido tanto a su capacidad para medir relaciones isotópicas de forma exacta y precisa, que permite el desarrollo de metodologías basadas en IDA específico o no específico para el control de THMs, como a su capacidad de ionizarlos en el plasma generando señales independientes de su estructura química, que ofrece la posibilidad de desarrollar métodos basados en la cuantificación a través de CIC. Sin embargo, también se deben tener en cuenta ciertas limitaciones como los bajos grados de ionización del Cl y Br en el plasma debido a sus altos potenciales de ionización (ver sección A.3.1.3) así como la presencia de interferencias espectrales que afecten a la señal medida.

En la *Tabla 37* se muestran las principales interferencias poliatómicas que afectan a los isótopos de Cl y Br. En el caso del acoplamiento GC-(ICP)MS las interferencias más importantes para la detección de Cl y Br serían las debidas al O que está presente en el plasma procedente del ambiente (plasma a presión atmosférica) y las de Ar que es el gas que se utiliza para generar el plasma. Dado que el contenido en oxígeno del plasma seco es bajo, las únicas interferencias esperables a niveles elevados son la del $^{36}\text{Ar}^1\text{H}^+$ sobre el ^{37}Cl y la del $^{40}\text{Ar}_2^1\text{H}^+$ sobre el ^{81}Br .

Tabla 37. Principales interferencias por formación de iones moleculares que pueden presentar Cl y Br para cada uno de sus isótopos, resolución necesaria para separarlas y gases empleados en la celda de colisión y reacción

Isótopo	m/z	Interferencias	Resolución*	Gas de colisión ^{1,2}
³⁵ Cl	35	¹⁶ O ¹⁸ O ¹ H ⁺ , ³⁴ S ¹ H ⁺	1200, 6200	He: 2.5 mLmin ⁻¹
³⁷ Cl	37	³⁶ Ar ¹ H ⁺ , ³⁶ S ¹ H ⁺	5000, 5000	ó
⁷⁹ Br	79	³⁸ Ar ⁴⁰ Ar ¹ H ⁺ , ⁴⁰ Ar ³⁹ K ⁺ , ³¹ P ¹⁶ O ₃ ⁺	7000, 12500, 2300	He: 1 mLmin ⁻¹
⁸¹ Br	81	⁴⁰ Ar ⁴⁰ Ar ¹ H ⁺ , ³² S ¹⁶ O ₃ ¹ H ⁺ , ³³ S ¹⁶ O ₃ ⁺	6000, 2000, 2000	H ₂ : 4 mLmin ⁻¹

* Los valores de resolución son aproximados y están calculados mediante "Interferences Workshop" del software del equipo Element 2 (Thermo Finnigan)

La corrección de este tipo de interferencias se suele llevar a cabo mediante equipos de alta resolución^{3,4} o trabajando con celdas de colisión y reacción utilizando helio y/o hidrógeno como gases de celda.^{1,2} En algunos casos también se puede minimizar la formación de ciertos iones moleculares que causan interferencias sobre los analitos de interés recurriendo a los plasmas fríos, que consisten en el uso de bajas potencias de radiofrecuencias y altos flujos de gas portador de forma que se enfría el plasma en la zona de muestreo. Sin embargo esta opción no sería muy adecuada en el caso de los halógenos ya que el plasma frío tiene menor capacidad de ionización dando lugar a grados de ionización aun más bajos y peores límites de detección. Cabe destacar que cuando el (ICP)MS se utiliza para la medida de señales transientes, como ocurre al acoplar GC para la separación previa de los analitos, la intensidad de la señal se obtiene integrando el área bajo la curva del pico cromatográfico obtenido al tiempo de retención del analito de interés y descartando la señal de fondo. Puesto que la señal aportada por los interferentes es constante, ésta será descartada al integrar los picos cromatográficos. Así, siempre que la relación señal/ruido sea lo suficientemente alta como para que no haya problemas en la precisión de los resultados, la presencia de interferencias poliatómicas para Cl y Br no afectará a la cuantificación de los THMs.

Como consecuencia, el (ICP)MS puede resultar muy adecuado para el control de THMs en aguas de consumo tras su separación por GC, favoreciendo el desarrollo de metodologías que permiten obtener resultados a partir de una única medida y sin necesidad de recurrir a la construcción de curvas de calibrado que alargan sensiblemente el proceso analítico.

D.1.2 Objetivos

El objetivo principal de este primer capítulo fue el desarrollo de una metodología analítica sencilla, rápida y fiable que permita llevar a cabo la determinación de trihalometanos en aguas de consumo mediante GC-(ICP)MS, con el fin de poder implementarla como método rutinario de análisis, cubriendo así las exigencias establecidas por la legislación española y comunitaria. La selección de la técnica de separación, GC, viene definida por los requisitos de la norma ISO 10301 mientras que la selección de la técnica de detección, el (ICP)MS, se basa en la posibilidad que ofrece este detector para realizar CIC dado que la fuente de ionización rompe todos los enlaces de las moléculas y genera iones monoatómicos y monopositivos. La utilización de un patrón interno que contenga tanto Cl como Br en su molécula permite la realización de calibrados de pendiente 1 y ordenada en el origen 0 lo que facilita enormemente la tarea del químico analítico.

Este objetivo principal se abordó a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Optimización de las condiciones de trabajo necesarias para la detección de cloro y bromo mediante el sistema GC-(ICP)MS.
2. Optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los cuatro trihalometanos y el patrón interno.
3. Estudio de la independencia de la respuesta instrumental obtenida mediante el sistema GC-(ICP)MS con la estructura molecular del compuesto que generó dicha señal.
4. Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de THMs en aguas
5. Determinación de THMs en muestras de agua de grifo tomadas en distintos puntos de la red de distribución de Asturias
6. Validación de la metodología desarrollada mediante el análisis de un material de referencia certificado (SRM 1639)

D.1.3 Resultados

D.1.3.1 Artículo científico I: *J. Anal. At. Spectrom.* 2007, 22, 1138–1144[View Online](#)

PAPER

www.rsc.org/jaas | Journal of Analytical Atomic Spectrometry

Determination of trihalomethanes in drinking water by GC-ICP-MS using compound independent calibration with internal standard†

Adriana González-Gago, Juan Manuel Marchante-Gayón and José Ignacio García Alonso*

Received 2nd April 2007, Accepted 3rd July 2007

First published as an Advance Article on the web 25th July 2007

DOI: 10.1039/b705035f

Compound independent calibration with an internal standard in combination with GC-ICP-MS allowed standardless determination of trihalomethanes (CHCl_3 , CHBrCl_2 , CHBr_2Cl and CHBr_3) in drinking waters following European Norm ISO 10301. It was demonstrated that the ratio of peak areas (analyte to internal standard) is linear with the ratio of concentrations with slope of 1 and intercept of 0, both for chlorine and bromine, when the concentrations of analyte and internal standard are expressed in terms of elemental concentrations. Then, the use of CBrCl_3 as internal standard allowed the simultaneous determination of all four compounds in one single injection by detecting chlorine at mass 35 and bromine at mass 79. For the determination of trihalomethanes (THMs) in drinking waters the method required only the addition of a known amount of internal standard to 100 mL of sample, the extraction of the THMs using 4 mL of n-pentane and the direct injection of the extract in the GC-ICP-MS system. No additional injections were required for quantitation. Extraction recoveries were between 80 and 98%, reproducibility was below 3% and method detection limits were below 0.01 ng mL^{-1} for all compounds, meeting the requirements of international legislation for the routine determination of THMs in drinking waters.

Introduction

Compound independent calibration (CIC) for the determination of organic compounds after a chromatographic separation is a recurrent topic in modern analytical chemistry.^{1–4} Traditionally, the coupling of gas chromatography with microwave induced plasmas (GC-atomic emission detector, AED) showed that CIC and molecular formula determination was possible under certain conditions.² For example, for split/splitless injection an apparent compound dependence of the AED response was observed due to compound discrimination at the injector.² Another GC detector showing compound independent capabilities is the pulsed flame photometric detector (PFPD).⁵ For both the AED and the PFPD quenching of the analyte signal by high concentrations of co-eluting compounds was detected, pointing to one of the main drawbacks for universal CIC of GC detectors: matrix effects of co-eluting compounds. On the other hand, other popular detectors for gas chromatography, such as electron ionisation-mass spectrometry (EI-MS) or the electron capture detector (ECD), show responses that are compound specific depending on the actual ionization efficiency or electron capture tendency for each analyte, respectively.

The development of suitable interface systems for the coupling of the inductively coupled plasma to gas chromatography^{6–8} boosted the interest in compound independent

sensitivity, particularly with the GC-ICP-MS coupling, due to the more robust plasma in comparison to the MIP. In this sense, the detection of non-metals (such as Si,⁹ P, S, Cl, Br and I^{10} and Br and I^{11}) by GC-ICP-MS was shown to follow compound independent sensitivity, which was predicted years before by Chong and Houk¹² for the GC-ICP-MS coupling. In addition, compound independent sensitivity was also demonstrated for the HPLC-ICP-MS coupling in the field of phosphopeptide analysis,¹³ for selenium speciation¹⁴ and for the determination of phospho-nucleotides.¹⁵ In these cases, particular attention should be paid to gradient elution conditions when using organic modifiers.¹³

Another field in which compound independent sensitivity is evaluated, or sometimes assumed, is for species-unspecific isotope dilution analysis¹⁶ using ICP-MS detection. Using this technique, an enriched isotope of the element to be determined is added post-column after the chromatographic separation, in a chemical form which usually differs from that of the separated compounds. In general, no differences in elemental sensitivity is found for different elemental species by ICP-MS but this fact cannot always be assured, particularly when no standards with all elemental species detected are available. There are cases in which elemental sensitivity is demonstrated to be independent of the elemental species, such as for Se(IV), Se(VI) and selenomethionine,¹⁴ and others where the sensitivity, under certain conditions, is different for different species, such as for $(\text{CH}_3)_3\text{Pb}^+$ and Pb^{2+} in NaCl solutions¹⁷ as a result of nebulisation effects.

The initial objective of this work was to check for compound independent sensitivity for different halogenated compounds using GC-ICP-MS as the first step to developing a post-column isotope dilution analysis procedure using ^{37}Cl

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: jiga@uniovi.es; Fax: +34-985103125

† Presented at the 2007 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Taormina, Italy, February 18–23, 2007.

and ^{79}Br enriched isotopes. Problems with the supply of the enriched isotopes prompted us to check the possibility of using a natural abundance internal standard for quantitation. As can be seen below, when compound independent sensitivity is assured, the use of an internal standard eliminates the need for any methodological calibration of the response of the instrument, allowing for standardless determination of the analytes in a way which is similar to isotope dilution analysis.

The halogenated compounds selected for this work were the trihalomethanes (THMs). These compounds are the main disinfection by-products formed during water chlorination by the reaction between natural organic matter and chlorine.¹⁸ New regulations have been developed for the control of those substances in drinking water due to the adverse effects they can cause on human beings, so new methodologies for the quantification of THMs are needed. In this work we demonstrate that the elemental response for chlorine and bromine is linear and independent of the molecular structure for THMs (CHCl_3 , CHBrCl_2 , CHBr_2Cl and CHBr_3) and the selected IS (CBrCl_3) when using GC-ICP-MS. The optimum operational conditions for the GC separation and the ICP-MS detection are presented. The CIC methodology has been applied and validated for the determination of THMs in drinking water, showing adequate analytical characteristics in application of the European Legislation.¹⁹

Experimental

Instrumentation

A Varian (Varian Inc., Walnut Creek, CA, USA) Model 3400 gas chromatograph fitted with a split/splitless injector was used. For the separation of the four THMs and the internal standard a low polarity capillary column DB-VRX (J & W Scientific, Folsom, CA, USA; 60 m \times 0.32 mm \times 1.8 μm film thickness) was selected as it provides optimum resolution for the separation of volatile compounds. The gas chromatograph was coupled to a HP-4500 inductively coupled plasma mass spectrometer (Yokogawa Analytical Systems Inc., Tokyo, Japan) using the transfer line described in detail previously.⁶ Operating conditions are summarized in Table 1. The liquid-liquid extraction of the THMs and the internal standard was carried out by means of a mechanical shaker (Heidolph REAX 2, Kelheim, Germany). All standard solutions and samples were prepared gravimetrically using an analytical balance (Mettler-Toledo GmbH, Im Langacher, Switzerland).

Reagents and materials

A certified standard mixture of THMs (CHCl_3 , CHBrCl_2 , CHBr_2Cl and CHBr_3 , 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of each compound in methanol) was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The internal standard used in this work (CBrCl_3 , 99% purity) was obtained from Aldrich (Steinheim, Germany). Intermediate standard solutions of the THMs mixture and the internal standard were prepared in methyl *tert*-butyl ether (MTBE). Working standard solutions containing different concentrations of THMs and the same concentration of the internal standard were prepared in *n*-pentane daily. All the prepared solutions were stored in the dark at $-18\text{ }^\circ\text{C}$ until use. MTBE

Table 1 GC-ICP-MS operating conditions

GC and interface parameters	
Column	DB-VRX (60 m \times 0.32 mm \times 1.8 μm)
Injection mode	Splitless
Injection volume	1 μL
Carrier gas/inlet pressure	He/15 psi
Injection temperature	175 $^\circ\text{C}$
Interface temperature	255 $^\circ\text{C}$
Oven programme	45 $^\circ\text{C}$ (2 min) to 190 $^\circ\text{C}$ at 12 $^\circ\text{C min}^{-1}$ to 245 $^\circ\text{C}$ (5 min) at 30 $^\circ\text{C min}^{-1}$
ICP-MS parameters	
Rf power	1280–1300 W
Sampling depth	5.5–6.0 mm
Carrier gas flow rate	1.37–1.45 L min^{-1}
Intermediate gas flow rate	1 L min^{-1}
Outer gas flow rate	15 L min^{-1}
Isotopes detected	^{35}Cl , ^{37}Cl , ^{79}Br , ^{81}Br
Integration time	0.05 s per m/z
Ion lens setting	Daily optimisation

(purity $\geq 99.0\%$) and *n*-pentane (purity $\geq 99.0\%$) were both obtained from Fluka (Buchs SG, Switzerland).

A NIST certified reference material (SRM 1639) containing a mixture of halocarbons in methanol at different concentration levels (CHCl_3 6235 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, CHBrCl_2 389.9 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, CHBr_2Cl 124.6 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, CHBr_3 86.5 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, CCl_4 157.0 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, $\text{CHCl}=\text{CCl}_2$ 85.8 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, and $\text{CCl}_2=\text{CCl}_2$ 40.6 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) was obtained from LGC Promochem (Teddington, Middlesex, United Kingdom). Ultra-pure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Amber glass bottles of 500 mL with GL PTFE-lined screw caps were used for drinking water sampling. All the glass material was cleaned with detergent, rinsed with Milli-Q water and oven dried at 80 $^\circ\text{C}$ for at least 1 hour. Before its use glass material was brought to room temperature.²⁰

Analytical procedure

Five drinking water samples from different water supplies in Asturias (Spain) were collected in amber glass bottles. Before sampling, the tap was allowed to run for at least 10 min. After that, bottles were filled and sealed carefully in order to avoid analyte losses. Samples were transported and stored in the dark at 4 $^\circ\text{C}$. In all cases the THMs were extracted from the water samples within 24 hours and analysed within 48 hours after collection.²⁰

For the determination of THMs in drinking water 100 mL of water sample were placed in a glass volumetric flask with glass stopper. A known amount of internal standard and 4 mL of *n*-pentane as extractant were added to the water sample (all by weight). The mixture was mechanically shaken for 10 min and then organic extract was removed into an amber glass vial. The organic extracts were stored in dark at $-18\text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. Finally, 1 μL of the organic extract was injected into the GC-ICP-MS system.

Results and discussion

Compound independent calibration with internal standard

Compound independent calibration (CIC) is a quantitative technique based on the capability of certain detectors to

provide an elemental response independent of the chemical structure of the molecules which might contain the element. In this sense, the detector response would not be affected by the nature or the molecular structure of the analyte. If the detector is used in combination with a chromatographic separation the measured peak area should be proportional to the concentration of the element reaching the plasma regardless of the molecular structure of the compound.

If that is assumed, eqns (1) and (2) must be fulfilled by both the analyte and the internal standard:

$$[\text{Peak Area}]_{\text{analyte}} = k_x \times [\text{X}]_{\text{analyte}} \quad (1)$$

$$[\text{Peak Area}]_{\text{IS}} = k_x \times [\text{X}]_{\text{IS}} \quad (2)$$

k_x being the sensitivity constant (compound independent) for a given element X and $[\text{X}]_{\text{analyte}}$ and $[\text{X}]_{\text{IS}}$ the concentrations of the element X in the analyte and the internal standard, respectively. If we divide eqn (1) by eqn (2):

$$\frac{[\text{Peak Area}]_{\text{analyte}}}{[\text{Peak Area}]_{\text{IS}}} = \frac{[\text{X}]_{\text{analyte}}}{[\text{X}]_{\text{IS}}} \quad (3)$$

In this way, eqn (3) shows that the plot of peak area ratio between analyte and internal standard should follow a straight line with respect to the ratio of concentrations with slope 1 and intercept 0. This fact simplifies the calibration procedure for compounds containing the element X. As can be seen, eqn (3) does not contain any sensitivity factor as it occurs in other calibration strategies (external calibration or standard additions). Therefore, once it has been demonstrated that the elemental response of the ICP-MS is independent of the species measured, the determination of compounds containing this element is possible by means of a single chromatographic injection after the addition of a known amount of internal standard to the sample. Nevertheless, there are potential limitations of the method such as sensitivity drifts (which could affect long chromatographic runs) or matrix effects.

In this work CBrCl_3 was selected as internal standard for the determination of both chlorinated and brominated trihalomethanes in drinking water, X in eqn (3) being chlorine or bromine, respectively.

Fig. 1 shows the chromatographic separation of a standard solution mixture containing the four trihalomethanes and the internal standard. In this chromatogram isotopes ^{35}Cl , ^{37}Cl , ^{79}Br and ^{81}Br were monitored. As can be observed, the chromatographic conditions listed in Table 1 provided a good separation for the four trihalomethanes, the internal standard and the two solvents used (MTBE and n-pentane), without band broadening and with a reasonable acquisition time of ca. 16 min.

In order to obtain the calibration curve, standard solutions containing different concentrations ranging from 0 to $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ of each THM and CCl_4 and $1.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ of internal standard in n-pentane were injected into the chromatographic system and the chlorine and bromine signal monitored in the ICP-MS instrument. In all cases the peak areas were integrated and divided by the peak area of the internal standard. Then, the concentrations of the analytes (as Cl or Br) were divided by the concentration of the internal standard (also as Cl or Br). Finally, the concentration ratios were plotted as a function of the peak area ratios for chlorine (Fig. 2) and bromine (Fig. 3).

Table 2 shows the slopes and intercepts obtained for calibration curves measured in different days. The uncertainties indicated in Table 2 correspond to the standard deviation of both the slope and intercept obtained from the regression line. As can be observed, in both cases the calibration curve showed a slope and an intercept which were not statistically different from 1 and 0, respectively ($P = 0.05$). These data suggest that the ICP-MS response for chlorine and bromine is independent of the chemical structure of the different trihalomethanes, CCl_4 and the internal standard used in this case, and it allows us to assume safely that compound independent

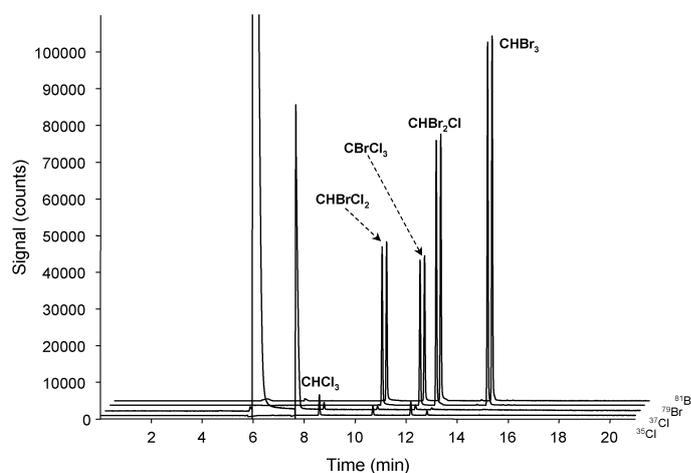


Fig. 1 Chromatogram obtained using the instrumental conditions summarised in Table 1 for the four trihalomethanes and the internal standard (CBrCl_3).

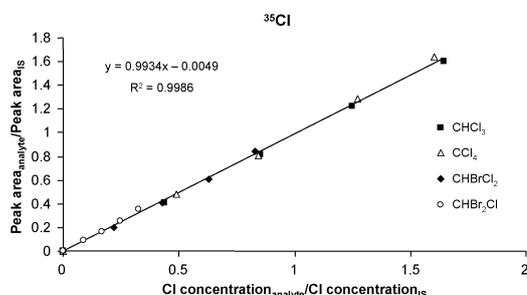


Fig. 2 Compound independent calibration curve obtained for chlorine.

calibration for chlorine and bromine can be obtained on a routine basis.

Analytical characteristics

Once the capabilities of the ICP-MS to provide compound independent sensitivity for chlorine and bromine has been demonstrated, the next step is to calculate the extraction yields when the THMs are extracted from water into n-pentane. In this sense, two experiments were performed. First, the absolute recovery of the extraction of THMs with n-pentane was calculated by adding different amounts of THMs to a tap water sample. After extraction, using the analytical procedure explained before, the internal standard was added to the n-pentane solution containing the extracted THMs. Finally, 1 μL of this organic solution was injected in the chromatographic system. The concentrations found using eqn (3) were plotted against the expected concentrations. The slope of the curve obtained indicated the extraction recovery. As can be seen in Table 3 the extraction recovery was different for each compound, ranging from 70% to 95%. For the brominated THMs lower uncertainty was obtained when bromine was used for quantitation instead of chlorine, as can be observed in Table 3.

Secondly, the relative recovery of the procedure was calculated by adding both the internal standard and different amounts of THMs to a tap water sample. After that, samples were analysed using the analytical procedure explained before and the concentrations calculated using eqn (3) were plotted

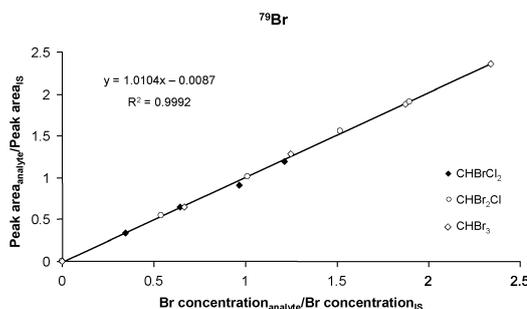


Fig. 3 Compound independent calibration curve obtained for bromine.

Table 2 Slopes and intercepts of calibration curves obtained in different days

Day	Cl ($m/z = 35$)		Br ($m/z = 79$)	
	Slope	Intercept	Slope	Intercept
1	0.92 ± 0.01	0.01 ± 0.01	1.03 ± 0.02	-0.01 ± 0.02
2	0.99 ± 0.01	-0.01 ± 0.01	1.01 ± 0.01	-0.01 ± 0.01
3	1.04 ± 0.03	0.03 ± 0.02	1.09 ± 0.02	-0.04 ± 0.02
Average	0.98 ± 0.03	0.01 ± 0.03	1.04 ± 0.02	-0.02 ± 0.03

against the expected concentrations. In this case, the slope of this curve indicated the method recovery as the internal standard was added to the sample instead of the n-pentane solvent. As is shown in Table 3, all recoveries are now between 80% and 100%.

Alternatively, the recovery of the analytical method for each compound was also calculated by using a standard reference material (SRM 1639) which contains the four THMs at different concentration levels (see Table 3). For this purpose an adequate amount of standard reference material and internal standard were added to Milli-Q water in order to obtain a sample with the same concentrations of THMs as those expected in real tap water samples. This spiked sample was analyzed using the proposed methodology. The accuracy of the method was calculated in this case by dividing the concentration found by the expected concentration. The average recovery obtained for the THMs were also between 80 and 100% and very similar to those obtained by the standard addition method, as can be seen in Table 3 (no statistical differences were found for $P = 0.05$ for the most sensitive isotope).

The reproducibility of the analytical procedure was calculated by analysing 5 Milli-Q water samples spiked with the standard reference material at levels between 54.62 ng mL^{-1} for CHCl_3 and 0.76 ng mL^{-1} for CHBr_3 . The relative standard deviations obtained for the four THMs are listed in Table 3. As can be observed, the reproducibility was below 3% in all cases except for CHBrCl_2 and CHBr_2Cl , when monitoring the chlorine signal at mass 35. This can be explained by taking into account the low sensitivity of the ICP-MS instrument for chlorine and the low concentration of these compounds in the sample. Fortunately, these two compounds can be determined by monitoring the bromine signal at mass 79 with much better sensitivity.

Instrumental limits of detection for the most sensitive isotope were calculated from the compound independent calibration curves as three times the standard deviation of the intercept divided by the slope. Method detection limits were calculated as three times the standard deviation of the intercept of the standard addition experiments with Milli-Q water, taking into account the recoveries of the method, and these are also given in Table 3.

The main analytical characteristics (method recovery, reproducibility and method detection limits) are compared in Table 4 with other recently published procedures for the determination of THMs in drinking water.^{21–27} As can be observed, all analytical procedures published include gas chromatography coupled to electron capture detection (ECD)^{21,23–27} or mass spectrometry (MS)^{22,27} with a variety

Table 3 Analytical characteristics

		Absolute extraction recovery (%)	Relative recovery (%)			LOD/ng mL ⁻¹	
			Standard additions	Reference material ^a	Reproducibility ^a <i>n</i> = 5 (RSD%)	Instrumental	Method
CHCl ₃	<i>m/z</i> = 35	69.4 ± 2.0	79.7 ± 4.9	81.4 ± 2.2	2.7	0.13	0.0063
	<i>m/z</i> = 79	—	—	—	—	—	—
CHBrCl ₂	<i>m/z</i> = 35	72.2 ± 6.2	80.6 ± 1.4	92.2 ± 5.0	5.6	—	—
	<i>m/z</i> = 79	77.3 ± 2.5	84.6 ± 0.6	87.1 ± 2.7	2.9	0.12	0.0057
CHBr ₂ Cl	<i>m/z</i> = 35	92.6 ± 3.9	93.7 ± 2.2	84.2 ± 25.8	31	—	—
	<i>m/z</i> = 79	88.3 ± 1.8	94.7 ± 0.7	92.8 ± 2.4	2.5	0.077	0.0033
CHBr ₃	<i>m/z</i> = 35	—	—	—	—	—	—
	<i>m/z</i> = 79	94.9 ± 2.5	100.7 ± 0.1	96.1 ± 3.0	2.8	0.062	0.0026

^a NIST SRM 1639: CHCl₃ (54.62 ng mL⁻¹), CHBrCl₂ (3.41 ng mL⁻¹), CHBr₂Cl (1.09 ng mL⁻¹) and CHBr₃ (0.76 ng mL⁻¹).

of sample preparation techniques including liquid–liquid extraction (LLE),²⁷ solid-phase microextraction (SPME),^{22,26} liquid phase microextraction (LPME)^{21,23} or capillary membrane sampling (CMS).²⁴ Overall, the performance of the method proposed here is equivalent to or better than most methods published previously with the added advantage that no methodological calibration is required.

Analysis of drinking water samples

The method was applied to the determination of THMs in drinking water samples from Asturias (Spain). Fig. 4 shows a typical chromatogram obtained for a drinking water sample spiked with the internal standard (sample 3 in Table 5). The concentrations of THMs in drinking water samples after recovery correction are given in Table 5 and were obtained by direct application of eqn (3).

The uncertainty for each concentration was calculated as the total combined uncertainty (coverage factor *k* = 2). The sources of uncertainty were the standard deviation of the compound independent calibration slope, the uncertainty in the recovery factors and the precision of the peak area ratio experimentally measured. To make the calculation, the following equation was used:

$$\left[\frac{s_C}{C}\right]^2 = \left[\frac{s_{RA}}{RA}\right]^2 + \left[\frac{s_b}{b}\right]^2 + \left[\frac{s_R}{R}\right]^2 \quad (4)$$

where *C* is the concentration, *RA* is the peak area ratio, *b* is the calibration slope, *R* is the method recovery and *s_C*, *s_{RA}*, *s_b*, and *s_R* are the standard deviations of the concentration, the peak area ratio, the calibration slope and the method recovery, respectively. The influence of the standard deviation of the peak area ratio on the total uncertainty increases as the concentration of the compound decreases in the samples. Thus, the standard deviation of the peak area ratio is the main uncertainty factor in the cases of CHBrCl₂ and CHBr₂Cl when monitoring the chlorine signal and for CHBr₃ due to the low concentration of this compound in the water samples.

In the case of CHBrCl₂ and CHBr₂Cl both elements, chlorine and bromine, can be monitored in order to quantify the concentration of these compounds in the samples as similar values were found (see Table 5). However, the total uncertainty monitoring the chlorine signal was always worse than that found when monitoring the bromine signal, as was explained before.

Results for corrected THMs concentrations and total THMs concentration (TTHMs expressed as the sum of the four THMs in ng mL⁻¹) are also summarised in Table 5. As can be seen, all water samples show TTHMs values below 150 ng mL⁻¹ which is the parametric value set by the European Union for water intended for human consumption (100 ng mL⁻¹ in 2008). In all cases the four THMs were detected and quantified. As expected, the abundance of these

Table 4 Analytical characteristics compared to other published analytical methods

	LLE-GC-ICP-MS This work	LPME-GC-ECD Ref. 21	SPME-GC-MS Ref. 22	LPME-GC-ECD Ref. 23	CMS-GC-ECD Ref. 24	LPME-GC-ECD Ref. 25	SPME-GC-ECD Ref. 26	LLE-GC-ECD Ref. 27	LLE-GC-MS Ref. 27
(a) Relative recovery (%)									
CHCl ₃	80	74	98	98	100	101	107	100	95
CHBrCl ₂	86	78	100	98	104	105	101	104	96
CHBr ₂ Cl	94	74	101	96	125	104	102	103	99
CHBr ₃	98	73	96	97	124	102	106	102	100
(b) Reproducibility (%)									
CHCl ₃	2.7	3	3.8	7	4.5	11.3	3.2	1.0	3.4
CHBrCl ₂	2.9	5	1.8	5	8.6	9.4	1.0	0.4	4.0
CHBr ₂ Cl	2.5	7	1.1	6	3.5	8.2	1.8	0.4	4.3
CHBr ₃	2.8	2	0.6	6	4.3	8.7	2.1	1.2	4.1
(c) Method detection limits/ng mL ⁻¹									
CHCl ₃	0.006	0.45	0.52	0.2	0.1	0.40	0.01	0.010	0.01
CHBrCl ₂	0.006	0.23	0.21	0.01	0.1	0.15	0.005	0.005	0.02
CHBr ₂ Cl	0.003	0.32	0.13	0.01	0.1	0.15	0.005	0.007	0.02
CHBr ₃	0.003	0.25	0.078	0.04	0.4	0.20	0.01	0.010	0.03

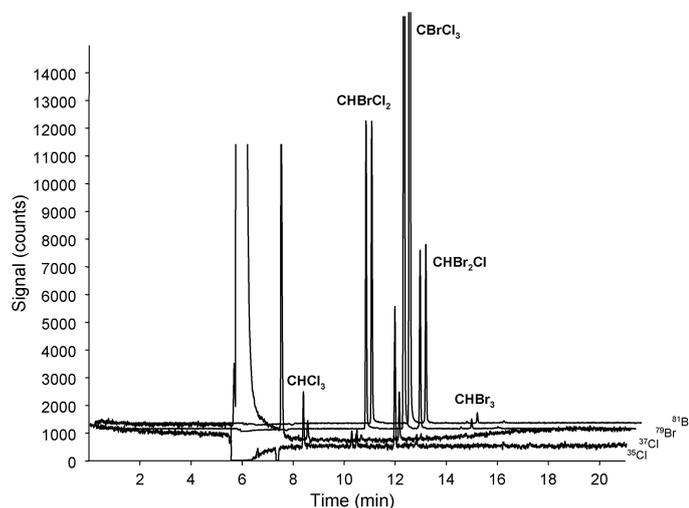


Fig. 4 Chromatogram of a tap water sample.

Table 5 Concentration of THMs (ng mL⁻¹) in drinking water samples, uncertainty expressed as total combined uncertainty (coverage factor $k = 2$)

	CHCl ₃		CHBrCl ₂		CHBr ₂ Cl		CHBr ₃		TTHMs ^a
	$m/z = 35$	$m/z = 79$	$m/z = 35$	$m/z = 79$	$m/z = 35$	$m/z = 79$	$m/z = 35$	$m/z = 79$	
Blank	0.3 ± 0.3	—	n.d.	0.03 ± 0.02	n.d.	n.d.	—	n.d.	0.33
Sample 1	10.1 ± 1.2	—	3.2 ± 0.4	3.3 ± 0.3	1.1 ± 0.9	1.1 ± 0.1	—	0.09 ± 0.02	14.6
Sample 2	20.1 ± 1.9	—	4.2 ± 0.6	4.5 ± 0.4	0.8 ± 0.6	0.50 ± 0.04	—	0.014 ± 0.001	25.1
Sample 3	17.9 ± 1.7	—	6.2 ± 1.3	6.4 ± 0.5	6.3 ± 13.7	2.2 ± 0.2	—	0.16 ± 0.02	26.7
Sample 4	3.4 ± 0.3	—	3.1 ± 0.6	3.1 ± 0.3	1.8 ± 2.0	1.6 ± 0.1	—	0.17 ± 0.02	8.3
Sample 5	22.1 ± 2.6	—	4.9 ± 1.2	4.4 ± 0.4	2.1 ± 4.3	1.06 ± 0.08	—	0.30 ± 0.03	27.9

^a TTHMs = CHCl₃ ($m/z = 35$) + CHBrCl₂ ($m/z = 79$) + CHBr₂Cl ($m/z = 79$) + CHBr₃ ($m/z = 79$).

compounds decreases as the number of bromine atoms in the molecules increases.

Conclusions

As has been demonstrated, the sensitivity factor of ICP-MS for chlorine and bromine is independent of the compound, at least for the THMs and the internal standard used in this work, using the conditions given in Table 1. Consequently, an internal standard can be used for the determination of these compounds in drinking waters avoiding other time-consuming calibration methodologies such as external calibration or standard additions. In this sense, compound independent calibration using ICP-MS could be considered an interesting alternative to the most popular ECD or MS detectors, taking into account also the low limits of detection provided.

In CIC the internal standard plays a role similar to the isotopically enriched element used in post-column isotope dilution analysis. However, it must be remembered that CIC is only a quantification strategy which cannot compete with species-specific isotope dilution analysis in terms of the control of the recovery of the analytical procedure. Unfortunately, isotopically enriched THMs with Cl or Br are not commercially available.

Acknowledgements

A. González-Gago is grateful to the Ministry of Education and Science (MEC, Madrid, Spain) for his pre-doctoral fellowship. Financial support from the Asturian Government (FICYT project PC-04-46) is gratefully acknowledged.

References

- N. Kovacic and T. L. Ramus, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1992, **7**, 999–1005.
- N. A. Stevens and M. F. Borgerding, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4223–4227.
- J. T. Andersson, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **373**, 344–355.
- Y. Juillet, E. Gibert, A. Begos and B. Bellier, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **383**, 848–856.
- L. Chambers and M. L. Duffy, *J. Chromatogr. Sci.*, 2003, **41**, 528–534.
- M. Montes Bayón, M. Gutiérrez Cambor, J. I. García Alonso and A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 1317–1322.
- A. P. Vonderheide, J. Meija, M. Montes-Bayón and J. A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, **18**, 1097–1102.
- E. M. Krupp, C. Pêchevran, H. Pinaly, M. Motelica-Heino, D. Koller, S. M. M. Young, I. B. Brenner and O. F. X. Donard, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2001, **56**, 1233–1240.
- M. Edler, D. Metzke, N. Jakubowski and M. Linscheid, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, **17**, 1209–1212.

- 10 D. Pröfrock, P. Leonhard, S. Wilbur and A. Prange, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 623–631.
- 11 A. Schwarz and K. G. Heumann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **374**, 212–219.
- 12 N. S. Chong and R. S. Houk, *Appl. Spectrosc.*, 1987, **41**, 66–74.
- 13 A. Pereira Navaza, J. Ruiz Encinar and A. Sanz-Medel, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2007, **46**(4), 569–571.
- 14 L. Hinojosa Reyes, J. M. Marchante Gayón, J. I. García Alonso and A. Sanz-Medel, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 1557–1563.
- 15 C. Siethoff, I. Feldmann, N. Jakubowski and M. Linscheid *J. Mass Spectrom.*, 1999, **34**(4), 421–426.
- 16 P. Rodríguez González, J. M. Marchante Gayón, J. I. García Alonso and A. Sanz-Medel, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2005, **60**, 151–207.
- 17 K. G. Heumann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 318–329.
- 18 T. A. Bellar, J. J. Lichtenberg and R. C. Kroner, *J. Am. Water Works Assoc.*, 1974, **66**, 703–706.
- 19 Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption, *Off. J. Eur. Commun.*, 5.12.98, 330, 32–54.
- 20 Water quality, Determination of highly volatile halogenated hydrocarbons, Gas-chromatographic methods, EN-ISO 10301, 1997.
- 21 A. Tor and M. E. Aydin, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **575**, 138–143.
- 22 P. M. San Juan, J. D. Carrillo and M. T. Tena, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1139**, 27–35.
- 23 N. Vora-adisak and P. Varanusupakul, *J. Chromatogr., A*, 2006, **1121**, 236–241.
- 24 M. A. Brown and G. L. Emmert, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **555**, 75–83.
- 25 R. Zhao, W. Lao and X. Xu, *Talanta*, 2004, **62**, 751–756.
- 26 D. Cho, S. Kong and S. Oh, *Water Res.*, 2003, **37**, 402–408.
- 27 A. D. Nikolaou, T. D. Lekkas, S. K. Golfinopoulos and M. N. Kostopoulou, *Talanta*, 2002, **56**, 717–726.

D.1.4 Discusión de los resultados

La publicación científica titulada *Determination of trihalomethanes in drinking water by GC-(ICP)MS using compound independent calibration with internal standard* que se incluye en la sección D.1.3.1 recoge los principales resultados, discusiones y conclusiones sobre los objetivos de este primer capítulo, sin embargo hay algunos aspectos que no han sido discutidos en la publicación por lo que serán tratados a continuación.

D.1.4.1 Optimización de las condiciones de trabajo para la detección de cloro y bromo mediante el sistema GC-(ICP)MS

Para el desarrollo de la metodología descrita en este trabajo fue necesario en primer lugar optimizar las condiciones de trabajo para la detección de Cl y Br mediante (ICP)MS. Cuando se emplea la técnica de GC para la introducción de muestra en (ICP)MS se producen ciertas diferencias importantes con respecto a la introducción de muestra por nebulización convencional. Por un lado, el GC introduce las especies en el plasma en forma gaseosa, lo que supone importantes ventajas frente a la introducción de muestra en forma líquida como son la elevada eficiencia de transporte de la muestra gaseosa al plasma (100%) o la mayor eficacia de la ionización. Este hecho permite que más cantidad de analito llegue al plasma y se ionice, proporcionando mejores límites de detección y relaciones señal/fondo más altas. Por otro lado, en el plasma se dan unas condiciones especiales de trabajo, que se corresponden con los plasmas secos. Este tipo de plasmas están casi libres de efectos de matriz y generan menores cantidades de interferencias poliatómicas, por lo que es posible el uso de (ICP)MS con analizadores de tipo cuadrupolo para la determinación de especies que contengan un determinado elemento o heteroátomo¹ que pudiera estar fuertemente interferido cuando la muestra se introduce mediante nebulización convencional. Así pues, teniendo en cuenta que para el sistema GC-(ICP)MS las condiciones del plasma varían con respecto a las de un plasma en el que se introducen muestras líquidas⁵, fue necesario llevar a cabo una optimización de las condiciones de trabajo de este tipo de acoplamiento.

Para llevar a cabo la optimización se utilizó un sistema que permitió obtener una señal continua de Cl y Br al intercalarlo, entre la "T" Swagelok de 1/4" de la interfase y el tubo de PFA que arrastra los analitos desde la columna hasta el plasma. Este sistema funciona de forma semejante a una celda de difusión ya que se trata de una pieza

metálica en forma de T alargada, en cuyo brazo más largo se puede introducir un trocito de papel enrollado e impregnado en su parte superior con una sustancia que contenga Cl y Br para lograr la optimización simultánea de las condiciones de trabajo de ambos heteroátomos. Así, el gas portador entra por el brazo lateral de la “T” de la interfase y sigue su camino hacia el plasma, atravesando la “celda de difusión” (Figura 30). Cuando el Ar alcanza la zona donde se encuentra el trozo de papel impregnado con CHBr_2Cl lo va arrastrando de forma continua al plasma, generando una señal bastante estable para las masas correspondientes de Cl y Br. A través de esta señal continua se lleva a cabo la optimización de los parámetros que más afectan a la medida de la señal analítica (potencia de radiofrecuencias, flujo de gas portador, posición de la antorcha y voltaje de las lentes).

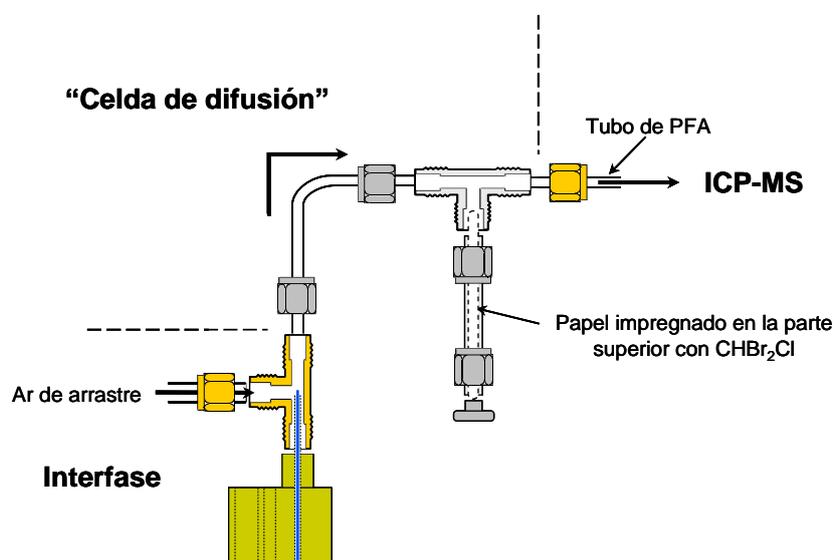


Figura 30. Esquema del sistema empleado para llevar a cabo la optimización de las condiciones del acoplamiento GC-(ICP)MS para la detección de cloro y bromo

Para realizar la optimización de los distintos parámetros se seleccionaron las masas menos interferidas para Cl y Br ($m/z = 35$ y $m/z = 79$ respectivamente), y además, en todos los casos se midió la relación $m/z = 76$ ($^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$) para evaluar la posibilidad llevar a cabo la optimización diaria a través del dímero de Ar, ya que resultaría mucho más cómodo y sencillo que mediante el uso del sistema de la Figura 30.

D.1.4.1.1 Optimización del flujo de gas portador y la potencia de radiofrecuencias

La potencia de radiofrecuencias y el flujo del gas portador son dos parámetros que están interrelacionados, siendo además los más críticos cuando se hacen medidas en

(ICP)MS. Para encontrar los valores óptimos de trabajo se seleccionaron distintos flujos de gas portador y se fueron variando las potencias de radiofrecuencias aplicadas. Como se puede observar en la *Figura 31*, las señales más altas tanto para el Cl como para el Br se obtienen para valores altos de flujo de gas portador y potencia de radiofrecuencias.

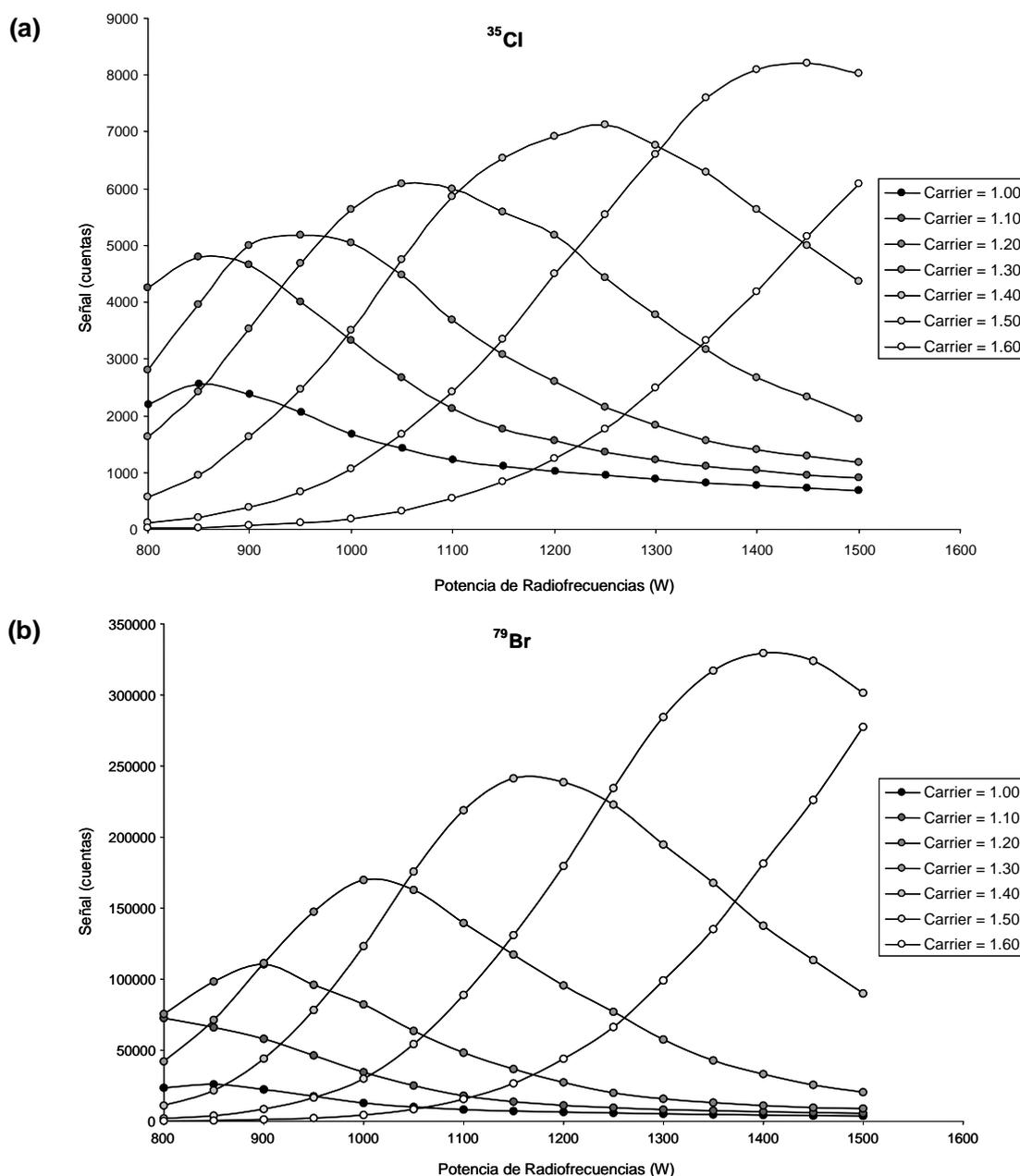


Figura 31. Dependencia de la intensidad de la señal obtenida con el flujo de gas portador (mL min^{-1}) y la potencia de radiofrecuencias para **(a)** Cl y **(b)** Br

Sin embargo, el comportamiento que presenta el dímero de Ar ($^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$) resulta algo diferente ya que la señal presenta su valor máximo para valores más bajos tanto de

flujo de gas portador como de potencia de radiofrecuencias (Figura 32). Por tanto, la optimización de estos parámetros no puede realizarse midiendo el dímero de argón. Por tanto, no fue posible llevar a cabo la optimización de estos parámetros a través de la medida de la señal para el dímero de Ar, aunque afortunadamente estos dos parámetros no necesitan ser optimizados diariamente.

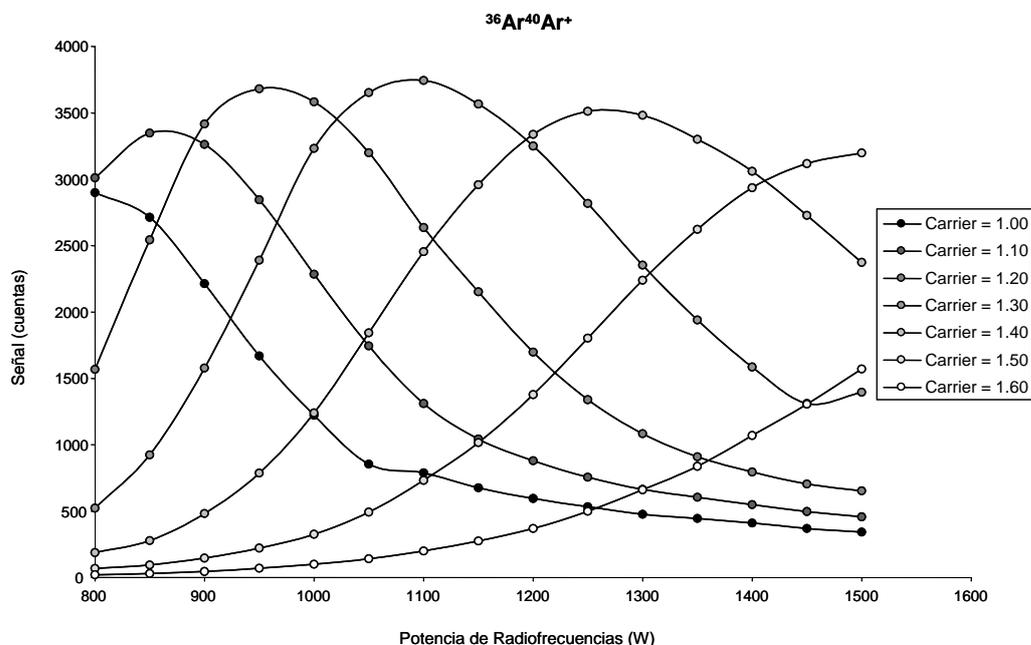


Figura 32. Dependencia de la intensidad de la señal obtenida para el dímero de Ar con el flujo de gas portador ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$) y la potencia de radiofrecuencias

D.1.4.1.2 Optimización de la posición de la antorcha

La posición de la antorcha (distancia entre el extremo de la antorcha y el primer cono de la interfase de extracción del (ICP)MS) es otro parámetro a optimizar cuando se realizan medidas mediante (ICP)MS. Se debe tener en cuenta la relación que existe entre la posición de la antorcha y el flujo de gas portador, de forma que, para un valor dado de potencia de radiofrecuencias, el flujo de gas portador debe ser mayor cuanto más alejada esté la antorcha del primer cono. En los estudios realizados se observó que, tras seleccionar los valores óptimos de flujo de gas portador y potencia de radiofrecuencias, la intensidad de la señal variaba muy poco con la posición de la antorcha para las tres relaciones m/z estudiadas, observándose un ligero aumento de la señal en el intervalo comprendido entre 5 y 6 mm (condiciones habituales de trabajo).

D.1.4.1.3 Optimización del voltaje de las lentes iónicas

Por último, se realizaron los correspondientes estudios para la selección de los valores más adecuados para el voltaje de las lentes *Extract 1*, *Extract 2*, *Omega +*, *Omega -* y *QP Focus*. En todos los casos estudiados, para unos valores óptimos de potencia de radiofrecuencias, flujo de gas portador y posición de la antorcha, el comportamiento de las relaciones m/z correspondientes a Cl y Br es el mismo que el observado para el dímero de Ar ($m/z = 76$). En la *Figura 33* aparece un ejemplo en el que se compara el comportamiento de $m/z = 76, 79$ y 81 para la lente *Extract 1*. Estos resultados son los esperados, ya que el voltaje de las lentes afecta a la transmisión y enfoque de los iones hacia el analizador de masas y no a la mejor o peor ionización de las especies en el plasma. Por tanto, la optimización de las lentes, que es el parámetro más variable, se llevó a cabo diariamente, para la detección de Cl y Br, a través de la relación $m/z = 76$ del dímero de Ar.

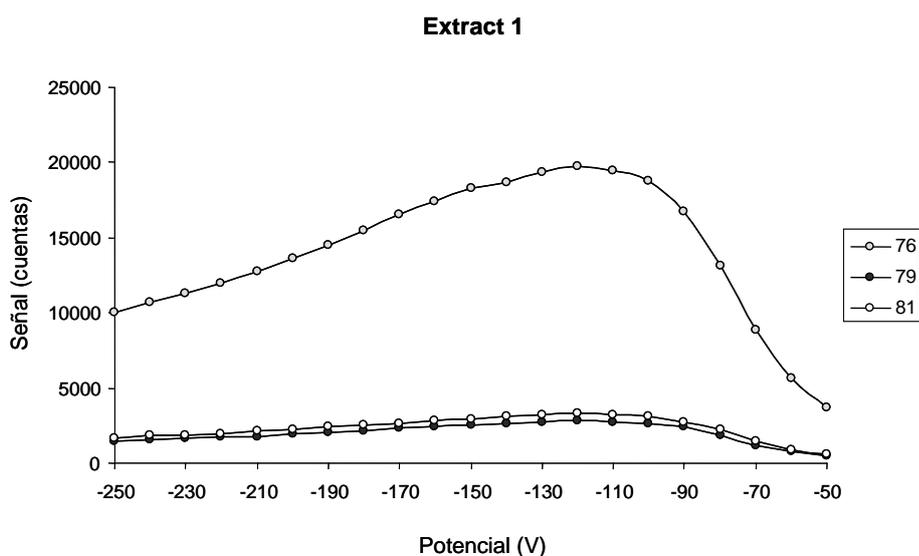


Figura 33. Dependencia de la intensidad de la señal obtenida para Br con el potencial aplicado a la lente *Extract 1*

D.1.4.2 Optimización de las condiciones cromatográficas

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de medida para el sistema GC-(ICP)MS se pasó a optimizar las condiciones cromatográficas para lograr una buena separación de los analitos y el patrón interno. Para ello se probaron dos columnas capilares, por un lado una HP5, que es una columna de uso general, no polar y con un amplio rango

de aplicabilidad y por otro lado la columna DB-VRX, que es una columna de baja polaridad específica para la separación de compuestos volátiles.

Para optimizar la separación cromatográfica se inyectaron unos 0,6-0,8 ng de cada uno de los THMs y 1,2 ng del patrón interno en cada una de las columnas con las condiciones que aparecen recogidas en la *Tabla 38*.

Tabla 38. *Condiciones cromatográficas para la separación de los trihalometanos y el patrón interno mediante las columnas HP5 y DB-VRX*

	HP5	DB-VRX
Temperatura de Inyección	175 °C	175 °C
Presión en Cabeza de Columna	15psi	15psi
Modo de Inyección	Splitless/Split	Splitless/Split
Tiempo de Splitless	1 min	2 min
Temperatura de la Interfase	255 °C	255 °C
Programa de Temperatura	35 °C (3 min) a 30 °Cmin ⁻¹ hasta 150 °C y a 50 °Cmin ⁻¹ hasta 255 °C (1 min)	45 °C (2 min) a 12 °Cmin ⁻¹ hasta 190 °C y a 30 °Cmin ⁻¹ hasta 245 °C (5 min)

Los resultados obtenidos se pueden ver en la *Figura 34*. Como se puede observar, la columna HP5 permite llevar a cabo la separación de los cuatro THMs y del compuesto seleccionado como patrón interno en unos 5 minutos, mientras que la columna DB-VRX necesita más de 15 minutos. Sin embargo, para conseguir la separación mostrada en la *Figura 34 (a)* es necesario iniciar el programa del horno a una temperatura muy baja (35 °C). Esto supone tiempos de espera relativamente largos para que el GC sea capaz de alcanzar y estabilizar la temperatura inicial antes de realizar una nueva inyección, por lo que el tiempo total de análisis entre dos inyecciones consecutivas se aproxima al empleado cuando se utiliza la columna DB-VRX.

Por otro lado, al observar con detalle las zonas ampliadas que se muestran en la *Figura 34*, se puede comprobar que la separación entre el disolvente y el primer compuesto que sale de la columna (CF), no es completa cuando se trabaja con la columna HP5, de modo que la señal del CF está afectada por la distorsión que produce en el plasma la

Por tanto, se seleccionó la columna DB-VRX para la determinación de THMs mediante GC-(ICP)MS utilizando las condiciones de trabajo recogidas en la *Tabla 31* de la parte experimental. En la *Tabla 39* se recogen las anchuras de pico y los tiempos de retención obtenidos en estas condiciones. En esta tabla se muestran los datos para $m/z = 35$ y 79 por ser las masas menos interferidas de cloro y bromo respectivamente. Los resultados reflejados corresponden a una inyección de 0.6 ng de cada uno de los trihalometanos y tetracloruro de carbono y 1.2 ng de patrón interno.

Tabla 39. *Tiempo de retención (t_R) y anchura de pico al 50% de su altura ($w_{1/2}$) para los THMs, tetracloruro de carbono y patrón interno en las condiciones cromatográficas óptimas*

Compuesto	$m/z = 35$		$m/z = 79$	
	t_R (min)	$w_{1/2}$ (min)	t_R (min)	$w_{1/2}$ (min)
CHCl ₃	8.696	0.048	--	--
CCl ₄	9.977	0.052	--	--
CHBrCl ₂	10.801	0.050	10.799	0.050
CBrCl ₃ (PI)	12.298	0.051	12.295	0.050
CHBr ₂ Cl	12.932	0.049	12.931	0.050
CHBr ₃	--	--	14.947	0.047

D.1.4.3 Determinación de THMs mediante GC-(ICP)MS

Como ya se ha comentado anteriormente el desarrollo de nuevas metodologías sencillas, rápidas y fiables para el control de THMs en aguas potables resultaría de gran utilidad para cumplir las exigencias de legislación vigente. El (ICP)MS ofrece la posibilidad de desarrollar métodos de cuantificación basados en IDA, lo que permite obtener resultados de gran calidad analítica reduciendo al máximo el tiempo de análisis.

El modo de IDA específico resulta especialmente adecuado debido a que, entre otras ventajas, permite corregir la deriva instrumental, los efectos de matriz y los rendimientos en procedimientos de extracción y separación no cuantitativos, lo que puede simplificar enormemente el procedimiento analítico. El desarrollo de la metodología de IDA específico requiere el empleo de patrones de cada uno de los THMs marcados isotópicamente. Sin embargo, estos patrones no están disponibles

comercialmente, por lo que resulta necesario sintetizarlos en el laboratorio. Teniendo en cuenta las importantes ventajas que puede proporcionar esta metodología se procedió a la puesta a punto de un método de síntesis para THMs basándose en reacciones sencillas descritas previamente en la bibliografía.^{6,7} En la *Figura 35* se muestran algunos ejemplos de las reacciones ensayadas.

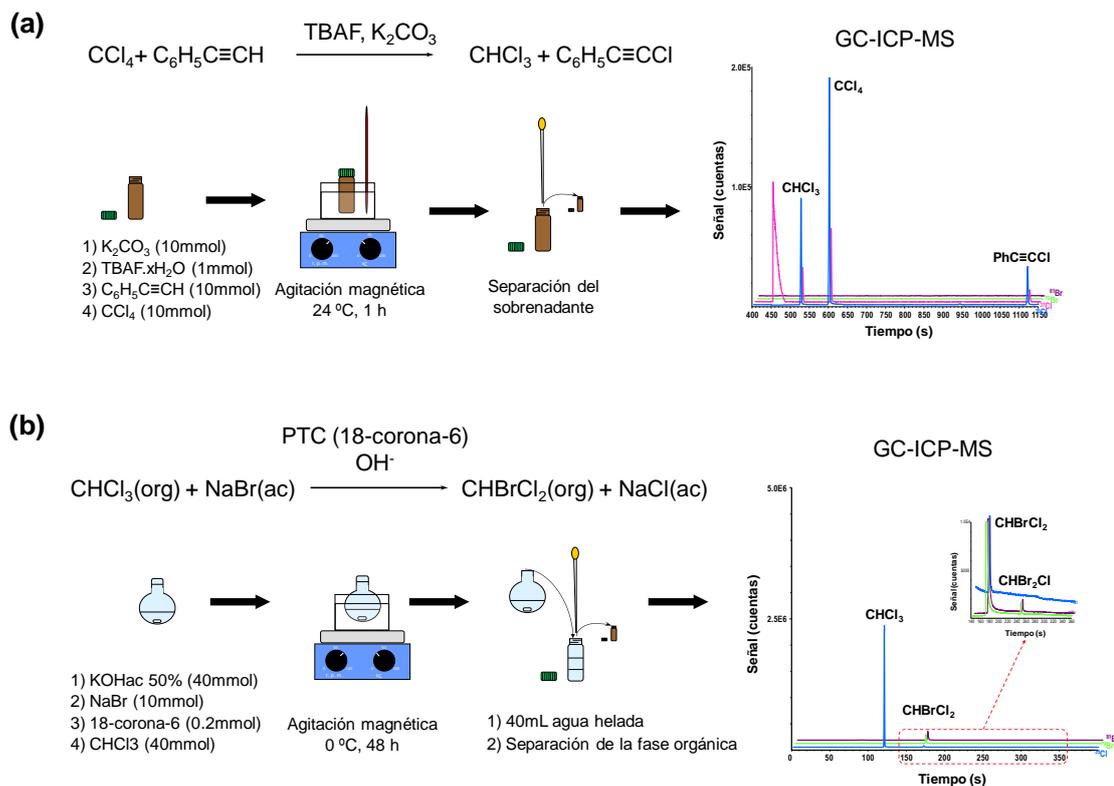


Figura 35. Esquema del proceso de síntesis y cromatogramas obtenidos para las reacciones de síntesis de **(a)** CF y **(b)** BDCM

Empleando estas reacciones se logró obtener alguno de los THMs aunque con rendimientos, en general, demasiado bajos. Teniendo en cuenta que el coste de los reactivos marcados isotópicamente, necesarios para la obtención de los analitos marcados, es relativamente elevado, resulta imprescindible que las reacciones empleadas presenten altos rendimientos para evitar que se produzca un encarecimiento significativo en el coste total del análisis. Por tanto, se intentaron modificar las condiciones de reacción (pH del medio de reacción, temperatura y tiempo de reacción) con el fin de mejorar los rendimientos, aunque desafortunadamente en ninguno de los casos se consiguieron rendimientos superiores al 50%. Debido a las dificultades encontradas para encontrar una reacción de síntesis óptima que permitiera la obtención de los THMs marcados en Cl y/o Br de un modo

sencillo y con rendimientos apropiados, se descartó la idea de desarrollar un método basado en IDA específico para la determinación de THMs y se planteó, como alternativa, la posibilidad de desarrollar un método basado en el modo inespecífico de IDA.

El primero de los requisitos necesarios para la aplicabilidad de IDA inespecífico es que tanto los analitos como la especie marcada que va a ser utilizada para su cuantificación presenten una señal independiente de su estructura molecular en el sistema instrumental empleado para realizar las medidas. Por ello se procedió a la evaluación del comportamiento de algunos HVOCs en el sistema GC-(ICP)MS. Los resultados obtenidos están recogidos en el artículo científico incluido en la sección D.1.3.1 donde se demuestra que tanto los THMs como el tetracloruro de carbono generan una respuesta independiente de su estructura en el sistema GC-(ICP)MS, permitiendo por un lado el desarrollo de una metodología de cuantificación para los THMs basada en CIC utilizando como patrón interno una sustancia con abundancias isotópicas naturales que contenga Cl y Br (ver sección D.1.3.1) y por otro lado la posibilidad de llevar a cabo la cuantificación mediante IDA inespecífico, utilizando, en este caso, uno o varios patrones de alguna sustancia volátil, enriquecida isotópicamente en Cl y/o Br, que pueda ser incorporada en forma gaseosa al flujo procedente de la columna cromatográfica (*post-columna*) para llevar a cabo la cuantificación. Sin embargo, cabe destacar que, desde un punto de vista práctico, la metodología de IDA inespecífico no resulta demasiado sencilla cuando se trabaja en fase gaseosa, ya que para obtener un flujo constante de la sustancia marcada se requiere un sistema que conste de una botella de gas que contenga la sustancia marcada, que generalmente consiste en una botella presurizada con He, u otro gas inerte, en la que se introduce una pequeña cantidad de la sustancia marcada, y un controlador de flujo másico que proporcione un flujo perfectamente constante del trazador.^{8,9} Como es lógico, esto requiere la disponibilidad de sustancias marcadas en Cl y Br que se mantengan en forma gaseosa a las condiciones de presión y temperatura que se dan dentro de la botella, lo que resulta bastante complicado, especialmente cuando se trata de sustancias bromadas.

Ante la dificultad que supone encontrar trazadores adecuados para este sistema y teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos para la determinación de THMs mediante CIC con patrón interno, se descartó finalmente la opción de desarrollar un método de IDA inespecífico, por lo que, a partir de ese momento el trabajo se centró en

la validación y evaluación de las características analíticas del método descrito en el artículo incluido en la sección D.1.3.1, cuyos resultados aparecen recogidos en el mismo artículo.

D.1.4.4 Aplicabilidad de la metodología desarrollada según los requisitos de la normativa Europea

Según el RD 140/2003,¹⁰ derivado de la Directiva 98/83/EC¹¹, desde el año 2008 el contenido total de THMs en aguas de consumo no debe superar el valor paramétrico de $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. La normativa vigente no especifica ningún método de ensayo para el control de este parámetro, sin embargo, tanto el RD 140/2003 como la Directiva 98/83/EC sí establecen las características que deben cumplir los métodos de ensayo empleados. Así, para que una metodología analítica sea aplicable a la determinación de trihalometanos en aguas de consumo debe presentar las siguientes características:

- 1) El límite de detección (LD) del método empleado debe presentar un valor máximo de un 10% del valor paramétrico indicado para cada uno de los cuatro THMs, es decir, el LD debe ser inferior a $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.
- 2) La exactitud de la determinación para los cuatro THMs, expresada como recuperación obtenida al 25% del valor paramétrico ($25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) debe encontrarse entre el 75% y el 125%.
- 3) La precisión, expresada como desviación estándar relativa debe ser inferior al 25% para una concentración de trihalometanos de $25 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ en agua.

Por tanto la determinación de THMs en aguas de consumo mediante CIC con patrón interno GC-(ICP)MS es posible siempre que el método desarrollado cumpla con las características mínimas especificadas en el RD. En el artículo incluido en la sección D.1.3.1 se describen los experimentos llevados a cabo para la obtención de las características analíticas que se recogen en la *Tabla 3* de dicha publicación. Como se puede observar la metodología desarrollada muestra valores de RSD (%) inferiores a 3% para todos los THMs, recuperaciones en el rango de 80-100% dependiendo del compuesto y LDs bastante por debajo de los indicados en el RD, por lo que se puede considerar que la metodología desarrollada para el control de THMs en aguas de consumo humano mediante CIC con patrón interno GC-(ICP)MS cumple los requisitos establecidos por la legislación Europea.

Por otro lado, en la EU solamente existe un método oficial para la determinación de THMs y otros compuestos orgánicos halogenados volátiles en aguas. La Norma Española EN ISO 10301, versión oficial en español de la Norma Europea EN ISO 10301, que a su vez adopta íntegramente la Norma Internacional ISO 10301:1997, propone un método para la determinación de estas especies basado en su separación por GC y posterior detección mediante un detector de captura electrónica u otro detector adecuado. Por tanto, el (ICP)MS seleccionado como detector en este trabajo se adecúa al cumplimiento de esta Norma.

Para la preparación de muestra, la Norma permite llevar a cabo la extracción y preconcentración de estos compuestos mediante LLE o HS. En este trabajo se seleccionó LLE como método de extracción y preconcentración de los analitos ya que se trata de una técnica barata, sencilla y robusta y que presenta, en general, mejores recuperaciones y límites de detección que HS. Teniendo en cuenta el bajo grado de ionización de Cl y Br en el ICP resulta más adecuado recurrir a las técnicas de extracción y preconcentración que proporcionen mayores factores de preconcentración.

Para llevar a cabo la LLE, la Norma propone el uso de recipientes de vidrio provistos de tapones de vidrio esmerilado en los que se deposita un volumen de muestra variable sobre los que se añade un volumen determinado de extractante según sea el factor de preconcentración que se quiere alcanzar. La relación de volúmenes de fase orgánica a fase acuosa puede variar entre 1:10 y 1:100. A continuación se agita vigorosamente la mezcla de forma mecánica o manual, se deja reposar hasta que se separen las dos fases y se aísla la fase orgánica (sobrenadante) con una pipeta de vidrio. Para la aplicación de la metodología desarrollada en este trabajo se emplearon matraces aforados de vidrio de 100 mL con tapón de vidrio esmerilado en los que se pusieron unos 100 mL de agua (controlados por pesada) y 4 mL de extractante (también controlado por pesada), se agitaron mecánicamente durante 10 minutos, se dejaron reposar y posteriormente se aisló la fase orgánica mediante una pipeta Pasteur de vidrio.

El disolvente seleccionado para llevar a cabo la LLE fue pentano, que es el recomendado por la Norma. Este disolvente es muy volátil, lo que favorece su separación de los analitos por GC sin que sea necesario recurrir a otros disolventes (hexano, éter de petróleo, heptano o xileno) que la Norma permite en caso de que

alguno de los compuestos de interés eluyan en la misma zona que el disolvente de extracción.

Para la obtención de las correspondientes curvas de calibrado, la Norma recomienda el uso de un patrón interno que corrija los errores debidos a la variabilidad del volumen inyectado y mejore las tasas de recuperación durante el proceso de preconcentración previo a la separación cromatográfica. Los patrones internos permitidos por la Norma son 1-bromo-2-dicloroetano ($\text{CH}_2\text{Br}-\text{CHCl}_2$), 1,2-dibromoetano ($\text{CH}_2\text{Br}-\text{CH}_2\text{Br}$), *trans*-1,2-dicloroetileno ($\text{CHCl}=\text{CHCl}$), bromotriclorometano (CBrCl_3) y 1,2-dibromo-1,1-dicloroetano ($\text{CBrCl}_2-\text{CH}_2\text{Br}$). En el presente trabajo se seleccionó, de entre todos ellos el CBrCl_3 , ya que contiene Cl y Br, lo que significa que sirve a la vez como patrón interno para las especies cloradas y para las bromadas. Además, el CBrCl_3 al contener tres átomos de Cl pero sólo uno de Br, permite inyectar en el sistema GC-(ICP)MS concentraciones más altas de patrón interno, mejorando así la señal obtenida para Cl sin que tenga lugar la saturación del detector por Br. Esto da lugar a mayores áreas de pico, lo que resulta muy adecuado para mejorar la precisión en la determinación de las especies cloradas, que suelen dar lugar a señales pequeñas debido a la baja sensibilidad del cloro en el (ICP)MS.

La cuantificación de los analitos, según la Norma, se lleva a cabo a través de las curvas de calibrado correspondientes para cada uno de los THMs. Para el análisis de rutina la cuantificación se puede realizar a través de un recalibrado, que consiste en un calibrado diario de al menos dos puntos que tengan concentraciones situadas en el 20% y el 80% del rango lineal previamente establecido. Obviamente, el modo de cuantificación propuesto en este trabajo no requiere una calibración diaria ya que, la curva de calibrado no contiene ningún factor de sensibilidad, por lo que únicamente es necesario comprobar que se cumple la metodología de calibración desarrollada inyectando un patrón que contenga todos los analitos y el patrón interno. Así pues, se puede decir que el método desarrollado cumple los requisitos generales previstos por el RD 140/2003 y se ajusta además a las recomendaciones incluidas en la Norma ISO 10301.

D.1.5 Referencias

- ¹ D. Pröfrock, P. Leonhard, S. Wilbur, A. Prange. **Sensitive, simultaneous determination of P, S, Cl, Br and I containing pesticides in environmental samples by GC hyphenated with collision-cell ICP- MS.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 623-631.
- ² J. K. Nicholson, J. C. Lindon, G. Scarfe, I. D. Wilson, F. Abou-Shakra, J. Castro-Perez, A. Eaton, S. Preece. **High-Performance Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HPLC-ICP-MS) for the analysis of xenobiotic metabolites in rat urine: application to the metabolites of 4-bromoaniline.** *Analyst*, 2000, 125(2), 235-236.
- ³ X. Bu, T. Wang G. Hall. **Determination of halogens in organic compounds by High Resolution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (HR-ICP-MS).** *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 1443-1451.
- ⁴ S. F. Boulyga, K. G. Heumann. **Direct determination of halogens in powdered geological and environmental samples using Isotope Dilution Laser Ablation ICP-MS.** *Int. J. Mass Spectrom.*, 2005, 242, 291-296.
- ⁵ J. Ruiz Encinar, I. Leal Granadillo, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Isotope ratio measurements using Gas Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for the assessment of organolead sources.** *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16, 475-480.
- ⁶ Y. Sasson, O. W. Webster. **Quaternary ammonium fluoride catalysed halogenation of carbon acids by polyhaloalkanes.** *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1992, 17, 1200-1201.
- ⁷ D. Sülzle. **Reactions of carbenes with anions.** *Tetrahedron Lett.*, 1987, 28 (24), 2769-2770.
- ⁸ J. Heilmann, K. G. Heumann. **Development of a Species-Unspecific Isotope Dilution GC-ICPMS method for possible routine quantification of sulfur species in petroleum products.** *Anal. Chem.*, 2008, 80, 1952-1961.
- ⁹ S. Cueto Díaz, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, J. I. García Alonso. **A quantitative universal detection system for organic compounds in Gas Chromatography with isotopically enriched ¹³CO₂.** *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, 48, 2561-2564.

¹⁰ **Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.** *Boletín Oficial del Estado N°45*, viernes 21 de Febrero 2003, 3596, 7228-7245.

¹¹ **Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.** *Official Journal of the European Communities*, 5.12.98, 330, 32-54.

**D.2 SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE DIFENIL ÉTERES
POLIBROMADOS ENRIQUECIDOS ISOTÓPICAMENTE
EN BROMO-81**

Artículo científico II. Adriana González-Gago, Juan Manuel Marchante-Gayón,
Miguel Ferrero, José Ignacio García Alonso

Synthesis of ⁸¹Br-labeled Polybrominated Diphenyl Ethers and their
characterization using GC(EI)MS and GC(ICP)MS

Anal. Chem., 2010, 82, 2879–2887

D.2.1 Introducción

Los PBDEs han sido ampliamente utilizados como retardantes de llama debido a su gran eficacia para el control de la propagación de incendios. Sin embargo, debido a la toxicidad que provocan sobre los seres vivos y a su capacidad para bioacumularse y biomagnificarse, los PBDEs se han clasificado como POPs y han sido incluidos en la mayoría de las listas de contaminantes prioritarios a nivel mundial. Como consecuencia ha sido necesario desarrollar leyes y normativas destinadas al control de estas sustancias en distintas muestras de interés medioambiental. Teniendo en cuenta los importantes efectos tóxicos que pueden provocar los PBDEs incluso tras la exposición a muy bajos niveles de concentración, resulta necesario el desarrollo de métodos de análisis que proporcionen LDs muy bajos así como una buena calidad y fiabilidad en los resultados analíticos.

En este contexto, la metodología de IDA en modo específico resulta muy apropiada, ya que se trata de un método de referencia que permite cuantificar con muy buena exactitud y precisión una gran variedad de compuestos, utilizando como patrón un compuesto análogo al analito, enriquecido isotópicamente en alguno de los átomos que componen la molécula. Tradicionalmente, la determinación de sustancias de naturaleza orgánica se ha llevado a cabo mediante patrones enriquecidos isotópicamente en ^{13}C , que se utilizan como patrón interno para la cuantificación de los analitos mediante las correspondientes curvas de calibrado. Sin embargo, como ya se ha explicado en detalle en la sección C.3.2.2.2, este tipo de patrones marcados pueden verse afectados por posibles efectos isotópicos y además su uso limita el empleo de las fuentes de ionización a aquellas sean capaces de generar fragmentos moleculares que conserven la marca, es decir, el átomo de ^{13}C . En el caso de los PBDEs esta limitación supone el empleo de la fuente de EI como única opción, ya que el uso de otras fuentes como ICP o ECNI da lugar principalmente a iones de Br, que al presentar abundancias naturales tanto para el analito como para el trazador no permite diferenciar las señales provenientes de cada uno de ellos.

Una buena alternativa que permite minimizar los efectos isotópicos así como el empleo de fuentes tanto atómicas como moleculares, es el uso de patrones marcados en heteroátomos (cualquier elemento excepto C, H, N u O). En el caso de los PBDEs, cuya fórmula molecular es $\text{C}_{12}\text{H}_n\text{OBr}_{10-n}$, será necesario disponer de patrones que lleven la

marca en el Br. Desafortunadamente, hasta el momento sólo están disponibles comercialmente patrones de PBDEs marcados isotópicamente en ^{13}C , por lo que para aprovechar las ventajas que ofrece el uso de patrones marcados con heteroátomos en la determinación de PBDEs será necesario sintetizarlos y caracterizarlos tanto en concentraciones como en abundancias isotópicas, ya que estos datos deben ser perfectamente conocidos para que el trazador pueda ser utilizado para la cuantificación mediante IDA específico.

D.2.2 Objetivos

El objetivo principal de este capítulo es la síntesis de PBDEs marcados con ^{81}Br y su caracterización en concentración y abundancias isotópicas para su posterior aplicación a la determinación de PBDEs mediante IDA específico en todo tipo de muestras de interés medioambiental.

Este objetivo principal ha sido abordado a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Optimización de las condiciones de la reacción de síntesis para la obtención de algunos PBDEs marcados en ^{81}Br .
2. Identificación de los congéneres obtenidos en el crudo de reacción.
3. Caracterización de los compuestos marcados en concentración y abundancia isotópica de Br mediante GC-(ICP)MS para su posterior aplicación a la determinación de PBDEs mediante IDA específico elemental.
4. Caracterización de los compuestos marcados en concentración y cálculo de los perfiles isotópicos de sus principales fragmentos moleculares mediante GC-(EI)MS para su posterior aplicación a la determinación de PBDEs mediante IDA específico molecular.
5. Evaluación del trazador sintetizado para la determinación de algunos PBDEs en muestras de agua.

D.2.3 Resultados

D.2.3.1 Artículo científico II: *Anal. Chem.*, 2010, 82, 2879–2887

Anal. Chem. 2010, 82, 2879–2887

Synthesis of ^{81}Br -Labeled Polybrominated Diphenyl Ethers and Their Characterization Using GC(EI)MS and GC(ICP)MS

Adriana González-Gago,[†] Juan Manuel Marchante-Gayón,[†] Miguel Ferrero,[‡] and J. Ignacio García Alonso^{*†}

Department of Physical and Analytical Chemistry, and Department of Organic and Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry. University of Oviedo, Spain

A mixture of different ^{81}Br -labeled polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) was prepared and characterized for its future use as spike for the isotope dilution analysis of PBDEs. The synthesis was carried out by direct bromination of diphenyl ether using ^{81}Br enriched Br_2 obtained after aqueous oxidation of bromide with potassium peroxydisulfate and extraction into dichloromethane. The number of bromine atoms introduced in the diphenyl ether molecule depended on the molar ratio between bromine and diphenyl ether. The final mixture prepared contained a mixture of tri-, tetra-, penta-, and hexabrominated PBDEs with a larger concentration of the tetrabrominated congener BDE-47. The isotopic composition of bromine in the resulting PBDEs mixture was determined by GC(ICP)MS and resulted in a 99.53% enrichment of the isotope 81 of bromine. The concentration of three of the PBDE congeners (28, 47, and 99) in the mixture was determined by reverse isotope dilution analysis using a certified, natural abundance, PBDEs mixture and both GC(ICP)MS and GC(EI)MS. For this purpose, the fragmentation and isotope distribution patterns of the different PBDE congeners in the positive electron ionization source were studied in detail both for natural abundance and labeled compounds. A procedure based on isotope pattern deconvolution was developed which allowed the direct determination of the concentration of the labeled PBDEs in the spike mixture by GC(EI)MS. Finally, the GC(EI)MS isotope pattern deconvolution procedure was applied for the determination of natural abundance congeners 28, 47, and 99 in spiked waters at ng L^{-1} levels. Detection limits below 0.5 ng L^{-1} could be obtained for all compounds using only 100 mL of sample and liquid–liquid extraction with isooctane.

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a group of flame retardants which are used as additives in a wide range of household materials to prevent or reduce fire development by

interfering with the combustion of polymeric materials.^{1,2} However, these compounds can be easily released into the environment and accumulated by living organisms.² Their wide distribution in the environment together with their high lipophilicity, resistance to degradation and bioaccumulation has raised concerns about the potential risks of PBDEs exposure to human health and the environment. In fact, these compounds have been detected in many biological and environmental samples (human adipose tissues, serum and breast milk, fish, birds, marine mammals, sediments, sludge, house dust, indoor and outdoor air, and supermarket foods),³ and toxicological studies suggest that they are linked to some adverse physiological effects.⁴ Additionally, many national and international regulations now require the determination of different PBDE congeners in environmental samples. For example, the European Union has issued a recent Directive⁵ in which congeners number 28, 47, 99, 100, 153, and 154 will need to be measured in European fresh waters at levels below 0.5 ng L^{-1} . Also, the U.S. Environmental Protection Agency include congeners 47, 99, and 100 in the unregulated contaminants list to be measured in fresh waters. Due to these analytical challenges, new methods for the determination of these compounds have been developed but they still need further improvement in terms of sensitivity, precision, and accuracy.⁶ Methods for the determination of PBDEs include GCECD (electron capture detector) and, more recently, GCMS. Different ionization sources have been used including electron ionization (EI),⁷ negative chemical ionization (NCI),⁸ and

- (1) Rahman, F.; Langford, K. H.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N. *Sci. Total Environ.* 2001, 275, 1–17.
- (2) de Wit, C. A. *Chemosphere.* 2002, 46, 583–624.
- (3) *Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) Project Plan*; U.S. Environmental Protection Agency: Washington DC, March 2006.
- (4) Covaci, A.; Voorspoels, S.; Ramos, L.; Neels, H.; Blust, R. *J. Chromatogr., A* 2007, 1153, 145–171.
- (5) Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, Amending and Subsequently Repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and Amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council; Official Journal Of the European Communities, December 24, 2008; 348, pp 84–97.
- (6) Covaci, A.; Voorspoels, S.; de Boer, J. *Environ. Int.* 2003, 29, 735–756.
- (7) Covaci, A.; de Boer, J.; Ryan, J. J.; Voorspoels, S.; Schepens, P. *Anal. Chem.* 2002, 74, 790–798.
- (8) Shin, M.; Svoboda, M. L.; Falletta, P. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 387, 2923–2929.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: jiga@uniovi.es.

[†] Department of Physical and Analytical Chemistry.

[‡] Department of Organic and Inorganic Chemistry.

inductively coupled plasma (ICP).⁹ In the past few years, GC(NCI)MS has become the technique of choice in many laboratories^{10,11} because of its high sensitivity and the selective detection of bromine as negative ion at masses 79 and 81. The use of GC(ICP)MS is also increasing as the detection limits provided by this technique are, on average, 10 times lower than those provided by GC(NCI)MS.¹²

The extensive sample preparation procedures required for the determination of PBDEs at ultratrace levels require the use of suitable internal standards for the correction of recoveries. In this regard, the use of labeled compounds as internal standards is a general procedure including fluorinated PBDEs and isotopically labeled compounds.¹² Many different laboratories have synthesized individual congeners both labeled and unlabeled during the last 10 years. Unlabeled PBDEs have been used as internal standards for the determination of PBDEs or for identification purposes. Labeled PBDEs have been employed mainly in toxicology studies (radioactive ¹⁴C)¹³ and for quantification purposes (¹³C) either as internal standards¹⁴ or using the isotope dilution method.^{15–18} Isotope dilution procedures are ideal for the determination of PBDEs as no recovery corrections from sample preparation are required. So far, only fully labeled ¹³C₁₂ PBDEs can be obtained commercially for this purpose. Unfortunately, these compounds are only suitable for the determination of PBDEs when GC(ED)MS techniques are applied. When the more sensitive and selective GC(ICP)MS or GC(NCI)MS techniques are used for detection these ¹³C-labeled compounds coelute with the native compounds and can not be used as internal standards because the label is lost during the ionization process.

In the past few years the concept of heteroatom labeling has been developed in different laboratories around the world mainly in combination with ICPMS detection and for trace element speciation. The synthesis and application of isotopically labeled organometallic compounds of environmental interest such as butyltin compounds, methylmercury and organolead compounds has been described.¹⁹ Using these labeled compounds, isotope dilution methodologies have been developed for both GC(ICP)MS and GC(ED)MS and some of those methodologies have been validated and accredited by testing laboratories.²⁰ The potential advantages of heteroatom labeling include the sensitive and

selective detection of the label by ICPMS¹² and the possibility of avoiding the methodological calibration graph as both the labeled and unlabeled compounds behave exactly the same without any detectable isotopic effects.

The use of enriched isotopes of bromine in the labeling of organic molecules has not been described in the literature in spite of the fact that bromine can be detected selectively both by ICPMS and NCIMS with low detection limits.^{12,18} So, the main objective of this work was the synthesis and characterization of some polybrominated diphenyl ethers labeled with ⁸¹Br for its future use in the determination of PBDEs in environmental and biological samples by isotope dilution analysis using both atomic and molecular ion sources. The synthesized compounds were characterized by GC(ICP)MS in isotopic composition and their fragmentation patterns were studied in detail using GC(EI)MS with a conventional electron ionization source in positive ionization mode. The determination of those compounds in the synthesized mixture was carried out by reverse isotope dilution analysis using the isotope pattern deconvolution algorithm recently applied in our laboratory for organic compounds and molecular ion sources.²¹

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents and Materials. Sodium bromide enriched in ⁸¹Br (99.62 atom %) was purchased from Trace International Sciences Corp. (Richmond Hill, ON, Canada), natural abundance sodium bromide (99.995% purity) was obtained from Fluka (Buchs, Switzerland) and diphenyl ether (99.9%) was purchased from Fluka. Oxone (potassium peroxydisulfate) was obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), anhydrous aluminum chloride and dichloromethane were from Fluka, and anhydrous sodium sulfate from Merck (Darmstadt, Germany). All glassware used for the synthesis of PBDEs was cleaned with detergent (Mucosol from Brand GMBH+CO KG, Wertheim, Germany), rinsed with Milli-Q water and dichloromethane, dried in an oven and brought to room temperature before its use.

Individual certified standards of seven PBDE congeners (28, 47, 99, 100, 153, 154 and 183, 50 µg mL⁻¹ in nonane) were obtained from Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA). The tetrabrominated ¹³C₁₂-BDE-47 (99% isotopic purity, 50 µg mL⁻¹ in nonane) was also obtained from Cambridge Isotope Laboratories. Working standard solutions of labeled and unlabeled PBDEs were prepared in isoctane (Sigma-Aldrich) by weight and stored in the dark at 4 °C until use. Diluted solutions of BDEs 28, 47, 99, 100, 153, and 154 were prepared in methanol (Fluka) for the water spiking experiments. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Gradient A10 water purification system (Millipore S.A.S, Molsheim, France).

Instrumentation. A GC model 6890N (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) fitted with a split/splitless injector and equipped with a MSD model 5975B (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) has been used in this work. Two microlitre solutions were injected in each case automatically by an autosampler model 7683 (Agilent). The chromatographic separation was carried out using

- (9) Vonderheide, A. P.; Montes-Bayón, M.; Caruso, J. A. *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 1480–1485.
- (10) Stapleton, H. M.; Keller, J. M.; Schantz, M. M.; Kucklick, J. R.; Leigh, S. D.; Wise, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 2365–2379.
- (11) Borghesi, N.; Corsolini, S.; Leonards, P.; Brandsma, S.; de Boer, J.; Focardi, S. *Chemosphere* **2009**, *77*, 693–698.
- (12) Swarouth, R. F. Jr.; Kucklick, J. R.; Davis, W. C. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23*, 1575–1580.
- (13) Alae, M. *Environ. Monit. Assess.* **2003**, *88*, 327–341.
- (14) Medina, C. M.; Pitarch, E.; López, F. J.; Vázquez, C.; Hernández, F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 1343–1354.
- (15) Luo, Q.; Wong, M.; Cai, Z. *Talanta* **2007**, *72*, 1644–1649.
- (16) Ackerman, L. K.; Wilson, G. R.; Simonich, S. L. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 1979–1987.
- (17) Gómar, B.; Herrero, L.; Bordajandi, L. R.; González, M. J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *20* (2), 69–74.
- (18) Eljarrat, E.; Lacorte, S.; Barceló, D. *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37*, 76–84.
- (19) Rodríguez-González, P.; Marchante-Gayón, J. M.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. *Spectrochim. Acta B.* **2005**, *60*, 151–207.
- (20) Centineo, C.; Rodríguez-González, P.; González, E. B.; Alonso, J. I. G.; Sanz-Medel, A.; Cardona, N. F.; Aranda Mares, J. L.; Nebot, S. B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384* (4), 908–914.

- (21) González Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G.; García Alonso, J. I. *Analyst* **2010**, DOI: 10.1039/B924432H.

Table 1. Operating Conditions

GC(EI)MS		GC(ICP)MS	
GC and interface parameters		GC and interface parameters	
column	HP-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)	column	TRB 5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)
injection mode	pulsed splitless	injection mode	split/splitless
splitless time	1.5 min	splitless time	1.5 min
pulse	30 psi, 1 min		
injection volume	2 μL	injection volume	1 μL
carrier gas/flow	He/constant flow 2 mL·min ⁻¹	carrier gas/inlet pressure	He/constant pressure 25 psi
injection temperature	300 °C	injection temperature	270 °C
oven program	120 to 300 °C (11 min) at 30 °C min ⁻¹	oven program	120 to 300 °C (11 min) at 30 °C min ⁻¹
interface temperature	255 °C	interface temperature	270 °C
EI ion source and MS parameters		ICP ion source and MS parameters	
source temperature	230 °C	Rf power	1280–1300 W
analyzer temperature	150 °C	sampling depth	5.5–6.0 mm
acquisition mode	SIM	carrier gas flow rate	1.37–1.45 L min ⁻¹
selected ions	See Table 6	intermediate gas flow rate	1 L min ⁻¹
dwell time	5 ms	outer gas flow rate	15 L min ⁻¹
solvent delay	3.5 min	selected ions	79, 81
		integration time	0.05 s per <i>m/z</i>
		ion lens setting	daily optimization

a low polarity capillary column HP-5MS (J&W Scientific, Folsom, CA, USA; 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness), as it has been one of the most used and tested for PBDEs.⁶ Operating conditions are summarized in Table 1.

A GC model 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) fitted with a split/splitless injector was coupled to a quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometer model 7500ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) using the transfer line described in detail previously.²² One microlitre solutions were injected manually in a low polarity capillary column TRB 5MS (Teknokroma, Barcelona, Spain; 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness). Operating conditions for the GC(ICP)MS coupling are also summarized in Table 1.

All standard solutions and mixtures were prepared gravimetrically using an analytical balance model AB204-S (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Switzerland). A mechanical shaker (Heidolph REAX 2, Kelheim, Germany) was used for the liquid–liquid extraction of PBDEs from water samples.

Procedures. *Synthesis of ⁸¹Br-Labeled PBDEs.* Approximately 55 mg of ⁸¹Br enriched NaBr, 1 g of Milli-Q water and 1.3 g of CH₂Cl₂ were introduced in a 7 mL amber vial. Then, 340 mg of oxone were added carefully over the stirred mixture and it was allowed to react at room temperature. After 15 min the organic layer containing ⁸¹Br₂ was removed from the vial and then filtered and dried using a Na₂SO₄ (anhydrous) column on a glass Pasteur pipet. After that, ca. 50 mg of AlCl₃ (used as catalyst) and 0.7 g of diphenyl ether were added over the organic layer and the mixture was stirred again for 6 h at 40 °C. Once the reaction was finished and the mixture reached room temperature, the organic layer was washed three times with water to remove the catalyst and other inorganic impurities. Then, it was filtered, dried (anhydrous Na₂SO₄) and the organic solvent evaporated under reduced pressure. The resulting mixture of PBDEs was finally redissolved in approximately 6.5 g of CH₂Cl₂.

Characterization of ⁸¹Br-Labeled PBDEs. The isotopic composition of bromine in the PBDEs labeled mixture was determined by injecting 1 μL of a diluted labeled standard solution in the

GC(ICP)MS system and both *m/z* 79 and 81 were measured. A natural abundance mixture of PBDEs was used for mass bias correction.

The concentrations of the congeners 28, 47, and 99 in the ⁸¹Br-labeled standard were determined by reverse isotope dilution analysis using natural abundance certified standards. Different mixtures of the natural and labeled standards were injected both in the GC(EI)MS and the GC(ICP)MS systems. The concentrations were calculated by isotope pattern deconvolution²¹ for GC(EI)MS and by the inorganic isotope dilution equation¹⁹ for GC(ICP)MS.

Determination of Congeners 28, 47, and 99 in Water Samples. Samples of 100 mL of Milli-Q water were placed in glass volumetric flasks with glass stoppers and spiked (by weight) with a mixture of natural abundance certified PBDEs (in methanol) to obtain three different concentration levels in water (ca. 1, 10, and 100 ng L⁻¹). Then, a known amount of the synthesized ⁸¹Br-labeled standard and approximately 4 mL of isoctane as extractant were added to each water sample. The mixture was shaken mechanically for 30 min and then most of the organic extract was removed, evaporated to a final volume of ca. 100 μL in an amber glass vial and stored in the dark at 4 °C until analysis. Finally, 2 μL of the organic extract were injected into the GC(EI)MS. Detection of five masses in SIM mode was performed for each compound. The concentration of congeners 28, 47, and 99 was calculated using the isotope pattern deconvolution procedure.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization of Synthesis Conditions. Optimization of the synthesis reaction was carried out using natural abundance sodium bromide. In this regard, different reaction methods were tried for the synthesis of PBDEs starting from diphenyl ether and sodium bromide. A priori, oxybromination of substituted aromatic compounds seemed to be the easiest and simplest alternative. This reaction consists of the electrophilic substitution of bromine generated in situ from bromide using an oxidizing agent.^{23,24} Different chemical reaction parameters, such as temperature,

(22) Montes Bayón, M.; Gutiérrez Cambor, M.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. *J. Anal. At. Spectrom.* **1999**, *14*, 1317–1322.

(23) Narender, N.; Srinivasu, P.; Ramakrishna Prasad, M.; Kulkarni, S. J.; Raghavan, K. V. *Synth. Commun.* **2002**, *32* (15), 2313–2318.

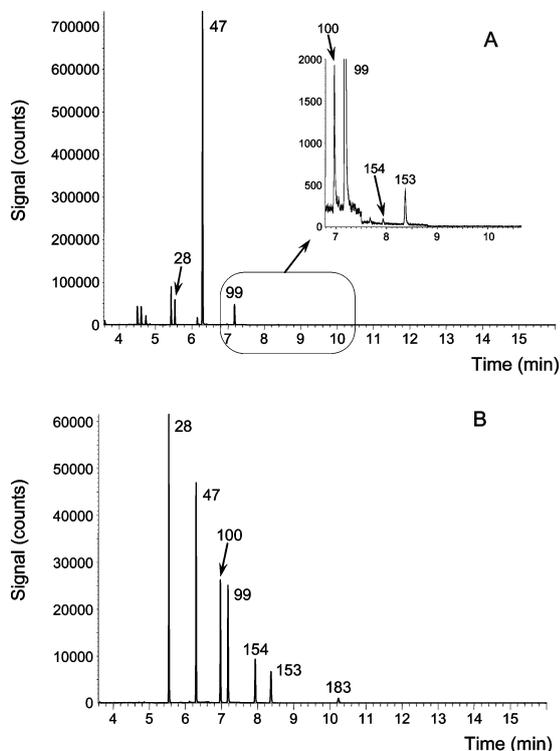


Figure 1. GC(EI)MS selected ion monitoring chromatogram for the synthesized spike (A) and the natural abundance standard (B). The concentration of the natural abundance standard was $1 \mu\text{g g}^{-1}$ and $2 \mu\text{L}$ were injected in the GC(EI)MS instrument.

amount, and type of oxidizing agent, catalyst, solvent, and time of reaction were evaluated. However, only low brominated congeners (tri- and tetrabrominated PBDEs) were obtained by this method at the optimal working conditions, so the reaction was not considered suitable since most of the PBDEs of primary interest⁴ were not present in the mixture. Because of this, a two-step reaction was tried next. The first stage of this reaction consisted on the oxidation of bromide to bromine by an oxidizing agent, followed by a second stage of electrophilic addition of bromine to diphenyl ether. This reaction was carried out at the previously optimized working conditions (oxybromination) so only the molar ratio between bromine and diphenyl ether was evaluated in this case.

Experimental results showed that a molar ratio of approximately 5:1 (bromine to diphenyl ether) allowed obtaining a mixture of PBDEs containing mainly the congeners found at higher levels in different biological and environmental samples which are the tetra and pentabrominated congeners.⁴ However, there are also other congeners recommended by international organisms to be monitored in the environment, mainly congeners 100, 153, and 154. These congeners could also be obtained from the same reaction but at much lower concentrations, as can be seen in Figure 1a. Once the working conditions were optimized the synthesis reaction was performed using ^{81}Br enriched sodium

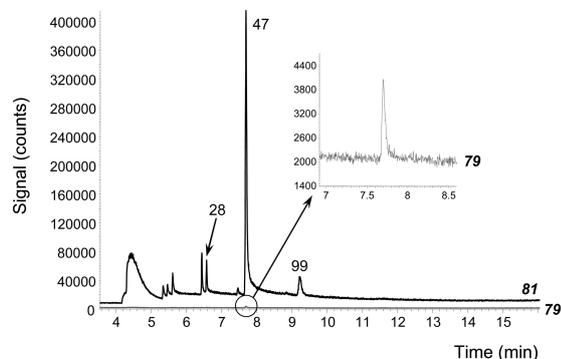


Figure 2. GC(ICP)MS chromatogram for the synthesized PBDE mixture.

bromide as described in the procedures. Figure 1a shows the chromatogram obtained by injecting $2 \mu\text{L}$ of the synthesized ^{81}Br -labeled PBDE mixture in the GC(EI)MS instrument and detection by selected ion monitoring while Figure 1b shows the chromatogram for the standard mixture of congeners 28, 47, 99, 100, 153, 154, and 183 at $1 \mu\text{g g}^{-1}$ for comparison purposes. As can be observed, the main compound in the mixture is congener 47 (tetrabrominated PBDE) with smaller amounts of congeners 28 (tribrominated PBDE) and 99 (pentabrominated PBDE). Also, congeners number 100 and 153 could be detected at much lower concentration levels (see Figure 1a, insert).

Characterization of ^{81}Br -Labeled PBDEs by GC(ICP)MS.

The isotopic composition of bromine in the enriched mixture of PBDEs was determined by GC(ICP)MS. Figure 2 shows one of the chromatograms obtained for a ca. 80 fold dilution of the enriched mixture. As can be observed, the peak for congener 47 is the main peak in the chromatogram. The signal at mass 81 is much higher than that at mass 79 which is shown expanded in the insert of Figure 2. Mass bias correction was carried out by using a natural abundance standard containing the mixture of the PBDEs of primary interest (congeners 28, 47, 99, 100, 153, 154, and 183) and the average natural isotopic abundances of bromine published by IUPAC²⁵ as reference. The resulting isotopic abundances (atom %) for the labeled PBDE congeners 28, 47, and 99 were of 99.53 ± 0.02 for isotope 81 and 0.47 ± 0.02 for isotope 79 (close to the nominal enrichment of 99.62% for the Na^{81}Br as supplied by Trace International Sciences Corp.). The bromine isotope enrichment for congeners 100 and 153 could not be determined because of its low concentration in the synthesis mixture.

The concentrations of the different PBDE congeners in the labeled standard were determined by reverse isotope dilution analysis using, initially, GC(ICP)MS and the certified natural abundance standards of PBDEs as reference. Figure 3 shows the chromatogram obtained at masses 79 and 81 (shifted for clarity) for one of the mixtures of natural abundance and enriched PBDEs by GC(ICP)MS. As can be observed, congener 47 shows enriched abundance while other congeners present at much lower concen-

(24) Krishna Mohan, K. V. V.; Narender, N.; Srinivasu, P.; Kulkarni, S. J.; Raghavan, K. V. *Synth. Commun.* **2004**, *34* (12), 2143–2152.

(25) De Laeter, J. R.; Böhlke, J. K.; De Bièvre, P.; Hidaka, H.; Peiser, H. S.; Rosman, K. J. R.; Taylor, P. D. P. *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 683–800.

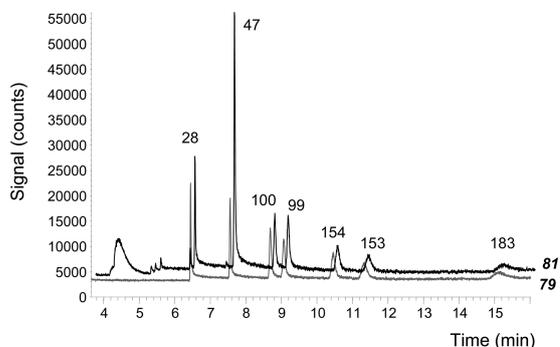


Figure 3. GC(ICP)MS chromatogram of a blend of natural and labeled PBDEs for reverse isotope dilution analysis.

tration levels in the enriched mixture (e.g., congeners 100 and 153) shown nearly natural isotope abundances. When comparing this chromatogram with those shown in Figure 1, it can be observed that the retention times are larger and that the peak profiles are wide and show pronounced tailing. This is due mainly to the fact that the gas chromatograph used for GC(ICP)MS could not work at constant flow (only constant pressure) and that affected the retention time and shape of high boiling point compounds. Also, the coupling interface used between the GC and the ICP-MS²² may not be completely suitable for high boiling point compounds such as PBDEs. The concentrations of the different compounds could still be determined based on the peak area ratios¹⁹ but with high experimental uncertainties. The GC(ICP)MS results will be discussed below in comparison with those obtained by GC(EI)MS.

Characterization of ⁸¹Br-Labeled PBDEs by GC(EI)MS.

We have recently demonstrated²¹ that isotope dilution analysis can be performed in molecular mass spectrometry using isotope pattern deconvolution in combination with minimal labeling, that is the use of a single ¹³C label in the molecule. For that purpose, the isotope pattern measured for the blend of natural abundance and labeled compound is separated by multiple linear regression into two contribution factors: the molar fraction of the natural abundance compound and the molar fraction of the labeled compound. It was demonstrated²¹ that the ratio of molar fractions was equal to the ratio of molar concentrations introducing the concept of calibration-free isotope dilution analysis in organic mass spectrometry. In order to apply this procedure for the determination of PBDEs labeled with ⁸¹Br (heteroatom labeling) we need first to study the fragmentation and isotope distribution patterns of the different PBDEs in the electron ionization source. Then, we need to select the best molecular cluster for the measurements taking into account the purity of the cluster and, finally, we need to perform the isotope dilution experiments.

Calculation of Theoretical PBDEs Isotope Distribution Patterns. The first requirement for the application of isotope pattern deconvolution in organic IDMS is that the isotope distribution patterns, or "mass isotopomer" distribution patterns, of both the natural abundance compound and that of the labeled compound are known.²¹ In our case, theoretical isotope patterns for the natural abundance and ⁸¹Br-labeled PBDEs were calculated both for the molecular ion (M^+) and for the main

Table 2. Theoretical Fragmentation Patterns for Tetrabrominated PBDEs

molecular ion (M^+)			loss of two bromine atoms ($M-2Br^+$)		
exact mass of fragment	natural abundance ^a	⁸¹ Br-labeled	exact mass of fragment	natural abundance	⁸¹ Br-labeled
483.7	0.2248	0.0000	323.9	0.2243	0.0000
484.7	0.0302	0.0000	324.9	0.0302	0.0000
485.7	0.3295	0.0001	325.9	0.4387	0.0082
486.7	0.0442	0.0000	326.9	0.0589	0.0011
487.7	0.2156	0.0162	327.9	0.2167	0.8647
488.7	0.0288	0.0022	328.9	0.0289	0.1165
489.7	0.0538	0.8567	329.9	0.0022	0.0089
490.7	0.0071	0.1154	330.9	0.0001	0.0005

^a Please note that masses 481.7 and 482.7 are not included. So, the sum of all abundances is less than 1.

fragmentation product where two bromine atoms were lost from the molecule ($M-2Br^+$) during fragmentation in the ion source.

For this purpose, a Visual Basic program was written as a macro for Excel using the calculation algorithm described by Kubinyi.²⁶ Data on the isotopic composition of the elements,²⁵ both natural and enriched, and the exact mass of the isotopes were introduced in the Excel spreadsheet and were read from the Visual Basic program. Finally, the resulting isotopic composition was returned to the Excel spreadsheet as output. The program was tested by calculating the isotopic composition of bovine insulin ($C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$) with satisfactory results in comparison to those published previously.²⁶

The theoretical mass isotopomer distributions of tri-, tetra-, penta-, hexa- and hepta-PBDEs were computed using natural abundance C, H, O and Br and also using enriched ⁸¹Br (99.53% enrichment as determined by GC(ICP)MS) both for the molecular ion and for the loss of two bromine atoms from the molecule. For example, the calculated mass isotopomer distributions for the natural and labeled tetrabrominated diphenyl ether (BDE-47) are shown in Table 2 for eight consecutive masses of the ion cluster both at the molecular ion M^+ and for the loss of two bromine atoms, $M-2Br^+$. As can be observed, the main peak in the M^+ cluster corresponds to exact mass 485.7 for the natural abundance compound while the main peak for the labeled compound is four masses higher at exact mass 489.7 with an isotope enrichment of ca. 86%. For the loss of two bromine atoms the mass difference was only two mass units with a higher isotope overlap particularly at the main mass of the labeled compound. Similarly, theoretical values for the isotope distributions of all PBDEs, both natural abundance and labeled, were obtained. From these calculations it was concluded that the molecular ion, M^+ , was the most suitable for the isotope dilution calculations as the mass overlap between natural abundance and labeled compounds was lower than for the loss of two bromine atoms in the molecule. Additionally, the molecular ion M^+ showed better selectivity (spectral interferences) than the $M-2Br^+$ cluster because of the higher mass and the larger mass defect due to the presence of bromine atoms in the fragment.

The developed mathematical procedure allowed also the computing of the standard uncertainties for the theoretical isotope

(26) Kubinyi, H. *Anal. Chim. Acta* **1991**, *247*, 107–119.

distributions.²⁷ The uncertainties in the natural isotope abundances of carbon, oxygen, hydrogen and bromine were propagated to obtain the uncertainties in the isotope composition of the molecules.²⁷ These values will be discussed below in comparison with the experimental isotope distributions measured.

Measurement of the Experimental PBDEs Isotope Distribution Patterns. For the measurement of the experimental fragmentation patterns a mixture of natural PBDEs in hexane was injected in the GC(EI)MS in full scan mode. The mass spectrum showed two main ion clusters for all congeners corresponding to the molecular ion and for the fragment obtained by the loss of two bromine atoms. The relative intensity of these two clusters changed as the number of bromine atoms in the molecule increased so it was decided to measure both clusters for each PBDE congener. To study the fragmentation pattern, mass windows consisting of the ten most abundant consecutive exact masses for each cluster, M^+ and $M-2Br^+$, were selected. A mixture of natural abundance PBDEs of ca. $1 \mu\text{g g}^{-1}$ of each congener in hexane and a diluted solution of the ^{81}Br labeled standard in hexane were injected in the GC(EI)MS in the SIM mode. Also, a solution of $1 \mu\text{g g}^{-1}$ of the $^{13}\text{C}_{12}$ labeled standard (BDE-47) in hexane was also injected in order to compare the fragmentation pattern of this compound with the results obtained for the natural abundance and ^{81}Br -labeled BDE-47. The experimental mass isotopomer distribution was calculated by dividing the peak area measured for each mass by the sum of all peak areas measured for a given molecular cluster. The results obtained for molecular ion M^+ of the three BDE-47 standards (natural abundance, ^{81}Br -labeled and $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled) are plotted in Figure 4 in comparison with the theoretical abundances calculated for these compounds. The experimental uncertainties correspond to the standard deviations from $n = 5$ independent injections while the theoretical uncertainties were calculated using the error propagation theory as described before.²⁷

As can be observed for all tetrabrominated compounds in Figure 4a–c, there is a good general agreement between the experimental and theoretical abundances. Similar results were obtained for all PBDEs considered. However, the experimental isotope abundances for low abundance masses are slightly higher than the theoretical values while the abundances of high abundance masses are slightly lower. This effect is particularly noticeable for the ^{81}Br -labeled compound in Figure 4b where the abundance of mass 488.7 is clearly higher than the theoretical value even when the uncertainty value is taken into account.

There are two possibilities in order to explain these results. First, it is possible that the mass peaks obtained in the quadrupole could spread to adjacent masses showing noticeable contribution to $M-1$ or $M+1$ ions or both. And, second, it is also possible that the measured clusters are not pure and are mixtures of, for example, M^+ and $M-H^+$ ions as has been observed before in the EI source.²⁸

In order to understand this behavior, the main ion clusters for the mass calibration compound perfluorotributyl amine (PFTBA) were measured under the same experimental conditions

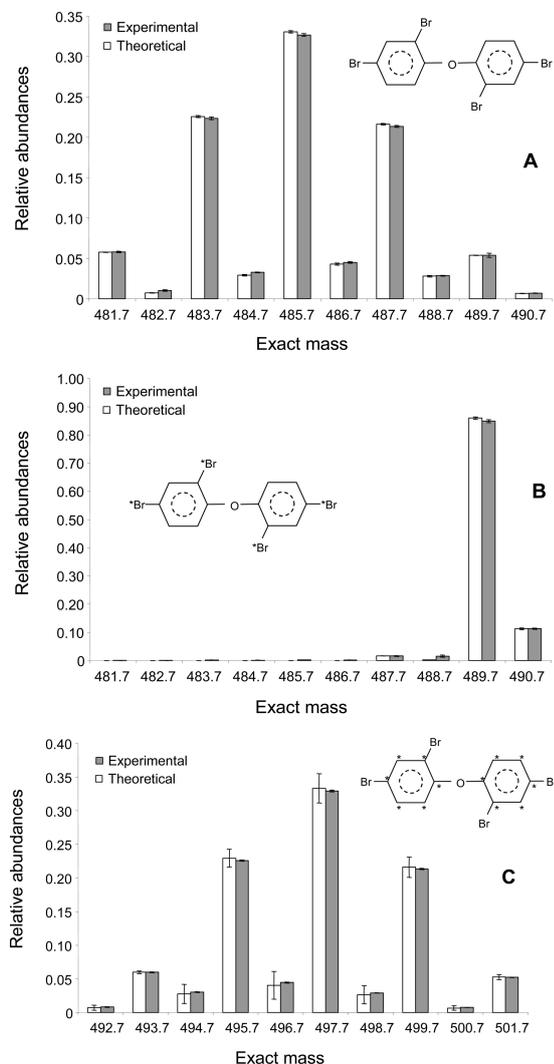


Figure 4. Comparison of the theoretical and experimental abundances for BDE-47 of (A) natural abundance, (B) ^{81}Br -labeled and (C) $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled.

as those employed for the PBDEs. The only difference was that the measurements were carried out on constant signals obtained with the calibration valve open during 1 min for each considered cluster (ca. 180 consecutive measurements). This compound was selected as it does not contain hydrogen in the molecule so the formation of overlapping $M-H^+$ ions would be impossible. The results obtained for several clusters of this compound are shown in Table 3. As can be observed, there is a noticeable contribution at mass $M-1$, from 0.4 to 0.7%, which increased with the mass of the cluster considered. For the mass range of the molecular ion of the PBDEs the contribution could be as high as 0.7%. This contribution is due to the tailing of the peak in the mass spectrum to the low mass side. On the high mass side, the contribution of natural abundance ^{13}C needs to be taken into account. For the clusters considered in Table 3 we have calculated the theoretical contribution at mass $M+1$ from the

(27) García Alonso, J. I.; Rodríguez-González, P.; González-Gago A.; and González Antuña A. *Anal. Chim. Acta* **2010**, DOI: 10.1016/j.aca.2010.01.063.

(28) Meija, J.; Centineo, G.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A.; Caruso, J. A. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40* (6), 807–814.

Table 3. Contribution at Masses M-1 and M+1 (%) from the Main M⁺ Peak of Perfluorotributyl Amine (PFTBA)

nominal mass (fragment)	M-1 contribution (%)	std dev (%)	M+1 contribution (%)	std dev (%)	Theoretical M+1 contribution (%)	uncertainty of the theoretical value (%)
69 (CF ₃ ⁺)	0.389	0.010	1.108	0.004	1.08	0.04
131 (C ₃ F ₅ ⁺)	0.488	0.004	3.278	0.010	3.24	0.12
219 (C ₄ F ₉ ⁺)	0.404	0.004	4.343	0.011	4.32	0.16
414 (C ₈ F ₁₆ N ⁺)	0.652	0.013	9.091	0.055	9.01	0.30
502 (C ₉ F ₂₀ N ⁺)	0.673	0.014	10.219	0.063	10.10	0.33

natural isotope abundance of ¹³C as indicated by the IUPAC (1.07%).²⁵ As can be observed in the table, the measured M+1 contribution is in agreement with the theoretical contribution within its uncertainty range. This means two things: the tailing of the mass spectrum at the high mass side is negligible and no mass bias effects are present in the mass range considered.

From these results it seems that the differences found between the theoretical and experimental abundances for the PBDEs, as shown in Figure 4, could be explained, at least partially, by the tailing of the peak in the mass spectrum to the low mass side. However, the presence of M-H⁺ ions in the spectra measured for the PBDEs needs to be evaluated.

Determination of the Fragmentation Patterns of PBDEs.

A requirement for the application of isotope pattern deconvolution in organic IDMS is that the fragmentation pattern of the target compound must be known in advance. Ideally, the ion cluster should be formed only by one ion type but this is not strictly required as long as the fragmentation pattern is constant. It is well-known that many organic compounds form ion clusters where more than one ion types overlap. The loss of hydrogen atoms is usually observed and this fact has to be taken into account in the calculation of the isotope patterns to be used. To evaluate the possibility of isobaric overlaps, with the loss of one hydrogen atoms in the experimental isotope patterns, the procedure described by Meija et al.²⁸ was followed. The theoretical isotopic composition of the different PBDE congeners was computed by the Visual Basic program described before assuming the possible loss of 0 or 1 hydrogen atom during fragmentation. Then, the theoretical patterns were compared to the experimentally observed fragmentation patterns and the contribution of the different isobaric fragment types evaluated by isotope pattern deconvolution. It was observed that the ion clusters for all PBDEs were consistent with a mixture of two components where the molecular ion was the main component and the loss of one hydrogen atom from the molecule was the minor component. The results obtained, as relative contribution to the ion cluster (in %) for all tested compounds are shown in Table 4 as the averages and standard deviations of the fragmentation patterns measured for a quintuplicate injection.

As can be observed for the molecular ions M⁺, the fragmentation pattern is approximately constant and seems to be independent of the labeling of the molecule and the number of bromine atoms present. For the M-2Br⁺ cluster, the contribution of the M-2Br-H⁺ fragment is higher but still lower than 2%. A further consideration is the day-to-day variability of the fragmentation pattern and the possible modification of the fragmentation pattern with the ionization conditions in the ion source. Day-to-day variations in the

Table 4. Experimental Fragmentation Pattern of PBDEs

congener	labeling	X _M	X _{M-H}	X _{M-2Br}	X _{M-2Br-H}
BDE-28	natural	98.8 ± 0.2	1.2 ± 0.2	93.6 ± 2.5	1.1 ± 2.4
	⁸¹ Br	97.7 ± 0.4	1.2 ± 0.3		
BDE-47	natural	98.8 ± 0.2	1.0 ± 0.2	97.8 ± 0.5	1.9 ± 0.4
	⁸¹ Br	97.6 ± 0.7	1.6 ± 0.5		
	¹³ C	98.5 ± 0.3	1.4 ± 0.3	98.0 ± 0.4	1.6 ± 0.4
BDE-99	natural	98.6 ± 0.3	1.3 ± 0.3	97.8 ± 0.5	1.7 ± 0.4
	⁸¹ Br	96.6 ± 0.6	1.7 ± 0.5		
BDE-100	natural	98.9 ± 0.3	1.1 ± 0.2	97.4 ± 0.6	1.7 ± 0.5
BDE-153	natural	98.7 ± 0.5	1.3 ± 0.4	97.3 ± 0.9	1.6 ± 0.7
BDE-154	natural	98.8 ± 0.4	1.2 ± 0.4	97.8 ± 0.7	1.5 ± 0.6

Table 5. Stability of the Fragmentation Factors Using Natural Abundance PBDEs

cluster	congener	day 1	day 2	day 3
M ⁺	BDE-28	98.8 ± 0.2	98.7 ± 0.2	98.6 ± 0.4
	BDE-47	98.8 ± 0.2	98.9 ± 0.1	98.7 ± 0.4
	BDE-99	98.6 ± 0.3	98.7 ± 0.4	98.7 ± 0.5
	BDE-100	98.9 ± 0.3	98.7 ± 0.3	98.8 ± 0.5
	BDE-153	98.7 ± 0.5	98.3 ± 0.4	98.1 ± 0.5
	BDE-154	98.8 ± 0.4	98.7 ± 0.5	98.3 ± 0.6
	M-2Br ⁺	BDE-28	93.6 ± 2.5	94.8 ± 1.2
BDE-47		97.8 ± 0.5	97.8 ± 0.4	97.4 ± 0.5
BDE-99		97.8 ± 0.5	97.5 ± 0.5	97.2 ± 0.9
BDE-100		97.4 ± 0.6	97.8 ± 0.7	97.1 ± 0.7
BDE-153		97.3 ± 0.9	97.5 ± 0.5	97.0 ± 1.2
BDE-154		97.8 ± 0.7	97.7 ± 0.4	97.5 ± 0.8

fragmentation patterns were also evaluated by injecting the natural abundance standards in the GC(EI)MS on two additional days. The results obtained are shown in Table 5 for the fragmentation factor of the main clusters. As can be observed, very consistent fragmentation factors are obtained on a day-to-day basis. The effect of the ionization conditions in the ion source on the fragmentation of the PBDEs was studied at three different electron acceleration voltages: 35, 70, and 140 eV. The results obtained (not shown) indicated that no effects of the acceleration voltage were detected.

Based on the results shown in Tables 3–5, the observed presence of the M-1 ion in the mass spectrum of the PBDEs is partially due to the tailing of the mass peak at the low mass side (ca. 0.6–0.7%) but the contribution of M-H⁺ ions needs to be considered to explain the observed fragmentation factors. Both effects are computed simultaneously by isotope pattern deconvolution. Finally, the selected measurement conditions are summarized in Table 6 together with the observed fragmentation factors. Finally, values of fragmentation factors of 0.987 for M⁺ and 0.013 for M-1 (or M-H⁺) were used for all compounds. For example, for each PBDE congener the isotope

Table 6. Selected Measurement Conditions and Obtained Fragmentation Factors by GC(EI)MS

number of Br atoms	ion cluster	mass window	main fragment (%) ^a	loss of hydrogen or M-1 tailing (%)
3	M ⁺	402.8–411.8	98.7	1.3
4	M ⁺	481.7–490.7	98.8	1.2
5	M ⁺	561.6–570.6	98.8	1.2
6	M ⁺	643.5–652.5	98.6	1.4

^a Average from three measurement days.

composition of the natural abundance compound at the M⁺ ion cluster was calculated as follows:

$$\begin{bmatrix} A_{\text{nat}}^1 \\ A_{\text{nat}}^2 \\ A_{\text{nat}}^3 \\ \dots \\ A_{\text{nat}}^{n-1} \\ A_{\text{nat}}^n \end{bmatrix} = 0.987 \cdot \begin{bmatrix} A_{M^+}^1 \\ A_{M^+}^2 \\ A_{M^+}^3 \\ \dots \\ A_{M^+}^{n-1} \\ A_{M^+}^n \end{bmatrix} + 0.013 \cdot \begin{bmatrix} A_{M-H^+}^1 \\ A_{M-H^+}^2 \\ A_{M-H^+}^3 \\ \dots \\ A_{M-H^+}^{n-1} \\ A_{M-H^+}^n \end{bmatrix} \quad (1)$$

taking into account the theoretical composition for each of the pure clusters M⁺ or M-H⁺. These calculations were performed for all labeled and natural abundance compounds.

Determination of the Concentrations of ⁸¹Br-Labeled PBDEs by GC(EI)MS. The fundamentals of isotope pattern deconvolution as applied for organic isotope dilution analysis were described elsewhere.²¹ In brief, the isotope distribution in the measured mixture of natural abundance and labeled compound (A_{mix}) is decomposed into two known isotope patterns corresponding to the contribution of natural (A_{nat}) and labeled (A_{lab}) compound by multiple least-squares. The basic isotope pattern deconvolution equation is:

$$\begin{bmatrix} A_{\text{mix}}^1 \\ A_{\text{mix}}^2 \\ A_{\text{mix}}^3 \\ \dots \\ A_{\text{mix}}^{n-1} \\ A_{\text{mix}}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{\text{nat}}^1 & A_{\text{lab}}^1 \\ A_{\text{nat}}^2 & A_{\text{lab}}^2 \\ A_{\text{nat}}^3 & A_{\text{lab}}^3 \\ \dots & \dots \\ A_{\text{nat}}^{n-1} & A_{\text{lab}}^{n-1} \\ A_{\text{nat}}^n & A_{\text{lab}}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} x_{\text{nat}} \\ x_{\text{lab}} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (2)$$

where n is the number of measured masses (here $n = 10$ or $n = 5$) and x_{nat} and x_{lab} are the unknown molar fractions of natural abundance and labeled compound respectively. As we have more equations than unknowns an error vector has to be included in the calculations. The values of the unknowns x_{nat} and x_{lab} are determined by multiple linear regression. The isotope dilution equation now reduces to

$$\frac{N_{\text{nat}}}{N_{\text{lab}}} = \frac{x_{\text{nat}}}{x_{\text{lab}}} \quad (3)$$

which indicates that the ratio of molar fractions is equal to the ratio of mols of natural and labeled compound in the spiked sample. As we know the mols of natural abundance compound added (in the case of a reverse ID experiment) the mols of the

Table 7. Concentration of the Labeled PBDEs in the Synthetic Mixture Obtained by Reverse Isotope Dilution Analysis

congener	GC(EI)MS		GC(ICP)MS
	cluster	concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)	concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$)
BDE-28	M ⁺	93.2 ± 0.2	81 ± 7
BDE-47	M ⁺	1161 ± 2	1233 ± 48
BDE-99	M ⁺	185.3 ± 0.3	168 ± 10

labeled compound can be determined directly using eq 3. The main advantage of this mode of performing isotope dilution analysis is that no calibration graph is required as the measurement of the molar fractions of natural and labeled analyte in the sample provide directly the concentration of the compound in the sample. For a direct isotope dilution experiment the mols of labeled compound added will be known and eq 3 will allow the determination of the mols of natural abundance compound in the sample.

Different mixtures of the natural abundance and the ⁸¹Br-labeled compounds were prepared and then injected in the GC(EI)MS instrument in order to determine the concentrations of the synthesized congeners by reverse isotope dilution analysis. For each congener three different blends were prepared by spiking the sample with each of the natural abundance standards sequentially (for BDEs 28, 47, and 99). Concentrations were calculated using eqs 2 and 3 and taking into account the weights taken from sample and spike and the molecular weights of the compounds, respectively. The results obtained are shown in Table 7 in comparison with those obtained previously by GC(ICP)MS using the inorganic isotope dilution equation¹⁹ after mass bias correction. The mean and standard deviations from three independent blend measurements are given for each technique. As can be observed, better reproducibility was obtained by GC(EI)MS in comparison with GC(ICP)MS which could be due to the bad peak profiles obtained by the GC(ICP)MS coupling. For future analytical work we have selected GC(EI)MS instead of GC(ICP)MS because of the poor performance of the coupling interface between the GC and the ICP source.

The concentration ratios found for BDEs 28, 47, and 99 are approximately 1:12:2. In this work we have applied the synthetic mixture directly in the knowledge that future work should be focused on the isolation of the different congeners and the preparation of mixtures with more similar concentration ratios.

Evaluation of a Simple Methodology for the Determination of PBDEs in Water Samples. Current European legislation⁵ require the routine determination of six PBDE congeners in continental waters at levels below 0.5 ng L⁻¹. In order to reach these low detection limits several preconcentration procedures have been published in the literature including micellar cloud point extraction²⁹ and hollow fiber microporous membrane liquid-liquid extraction.³⁰ Using the ⁸¹Br-labeled compounds we have evaluated a simple liquid-liquid extraction procedure in which 100 mL of the sample are measured in a glass volumetric flask and ca. 3–4 mL of isooctane are used for

(29) Fontana, A. R.; Silva, M. F.; Martinez, L. D.; Wuilloud, R. G.; Altamirano, J. C. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 4339–4346.

(30) Fontanals, N.; Barri, T.; Bergström, S.; Jönsson, J.-A. *J. C. J. Chromatogr., A* **2006**, *11133*, 41–48.

Table 8. Concentration of PBDE Congeners 28, 47, and 99 Determined in Spiked Water

congener	blank	level 1 ^a		level 2 ^a		level 3 ^a	
	concentration ^b (ng L ⁻¹)	concentration ^b (ng L ⁻¹)	recovery ^{b,c} (%)	concentration ^b (ng L ⁻¹)	recovery ^{b,c} (%)	concentration ^b (ng L ⁻¹)	recovery ^{b,c} (%)
BDE-28	0.07 ± 0.04	1.8 ± 0.4	137 ± 29	13.5 ± 0.5	102 ± 3	100 ± 1	87 ± 1
BDE-47	0.3 ± 0.1	1.8 ± 0.2	128 ± 13	12 ± 2	91 ± 12	103 ± 2	89 ± 2
BDE-99	0.10 ± 0.08	1.7 ± 0.5	123 ± 38	12 ± 1	91 ± 10	98 ± 2	85 ± 1

^a Samples spiked at level 1, 2, and 3 with approximately 1, 10, and 100 ng L⁻¹ of each congener, respectively. ^b The uncertainties correspond to the standard deviation from five injections of the same sample. ^c The recovery was calculated by subtracting the blank values and dividing by the theoretical concentration spiked.

extraction. Because of the isotope dilution procedure, the amount of isooctane added and the final volume of the extract does not need to be known precisely. In our case we have selected a final volume of ca. 100 μ L resulting in a preconcentration factor of approximately 1000.

For the evaluation of the procedures samples of Milli-Q water were spiked with a mixture of the six priority congeners dissolved in methanol in order to reach water concentrations of, approximately, 0 (blank), 1, 10, and 100 ng L⁻¹. The amount of each congener added was controlled gravimetrically. Then, a mixture of the ⁸¹Br-labeled PBDEs standard was spiked, a volume of ca. 3–4 mL of isooctane was added and, finally, the mixture shaken for 30 min in a rotary mechanical shaker. The amount of spike added was kept similar to the levels expected in the samples (a few ng of each compound per sample were required).

After extraction most of the organic layer was removed and evaporated down to ca. 100 μ L. From every sample five consecutive injections of 2 μ L were performed in the GC(EI)MS instrument to evaluate the instrumental precision. For the isotope pattern deconvolution procedure five masses were selected for each compound ($n = 5$ in eq 2) to improve counting statistics. Three of those masses corresponded to the most abundant masses of the natural abundance PBDE (for example, for BDE-47 these masses were 483.7, 485.7, and 487.7, see Table 2) and the other two masses corresponded to the most abundant masses in the labeled compound (for BDE-47 masses 489.7 and 490.7, see Table 2).

The final concentration results are given in Table 8 for the four samples prepared at different concentration levels. As can be observed, the recoveries can be considered quantitative for the two higher concentration levels as, in general, recoveries between 80 and 120% are acceptable in (ultra) trace analysis. The recoveries found at the lowest spiking level (120–140%) could be considered also satisfactory if their uncertainties were taken into account. The experimental repeatability was variable and ranged between 2 and 30% RSD depending on the concentration level assayed.

An estimation of the method detection limit can be obtained from the standard deviation of the measured blank values. Based on those data detection limits for congeners 28, 47, and 99 can be estimated to be 0.1, 0.4, and 0.2 ng L⁻¹, respectively, based on three times the standard deviation of the blank.

It is clear that a proper methodological development will require much more studies and results. However, we have shown that the ⁸¹Br-labeled compounds prepared may allow the development of routine analytical procedures capable of measuring PBDEs at the low concentration levels required by current international legislations.⁵

CONCLUSIONS

A mixture of different ⁸¹Br-labeled polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) was prepared by direct bromination of diphenyl ether using enriched ⁸¹Br. The obtained mixture was characterized in isotope composition and concentration both by GC(ICP)MS and GC(EI)MS. A method for the determination of the concentration of three of the PBDEs congeners (28, 47, and 99) in the mixture by isotope pattern deconvolution GC(EI)MS was developed. For this purpose, the capabilities of the GC(EI)MS coupling for the measurement of the isotope distribution patterns of the different PBDEs congeners was studied in detail. The contribution of the M–1 ion observed was ascribed partially to the tailing of the mass peak to the low mass side but the presence of M–H⁺ ions could not be ruled out. Finally, the prepared mixture was evaluated for the isotope dilution analysis of PBDEs in spiked water samples with promising results. Future work will be devoted to the isolation of the different PBDEs by liquid chromatography and the preparation of mixtures adequate for the determination of all six priority congeners (28, 47, 99, 100, 153, and 154). These compounds could find also application in the determination of PBDEs using the most sensitive negative chemical ionization (NCI) source.

ACKNOWLEDGMENT

The work described in this paper was supported by the Ministry of Science and Innovation, Madrid, Spain (project ref CTQ2006-05722). A.G.-G. acknowledges her doctoral grant from the FPU program of the Spanish Ministry of Science and Innovation.

Received for review December 18, 2009. Accepted February 18, 2010.

AC902889U

D.2.4 Discusión de los resultados

La publicación científica titulada *Synthesis of ⁸¹Br-labeled Polybrominated Diphenyl Ethers and their characterization using GC(EI)MS and GC(ICP)MS* que se incluye en la sección D.2.3.1 recoge los principales resultados, discusiones y conclusiones sobre los objetivos de este capítulo. Sin embargo hay algunos aspectos que no han sido discutidos en la publicación por lo que serán tratados a continuación.

D.2.4.1 Optimización de las condiciones de la reacción de síntesis

La síntesis de PBDEs a nivel industrial consiste, por lo general, en la bromación de difenil éter en presencia de un catalizador.^{1,2} Se trata de una sustitución electrofílica aromática que sigue el mecanismo mostrado en la *Figura 36* donde el ácido de Lewis utilizado como catalizador, que suele ser AlCl₃, FeCl₃, FeBr₃ o ZnCl₂, ayuda a aumentar la electrofilicidad de uno de los átomos de la molécula de Br₂ favoreciendo su incorporación al anillo aromático.

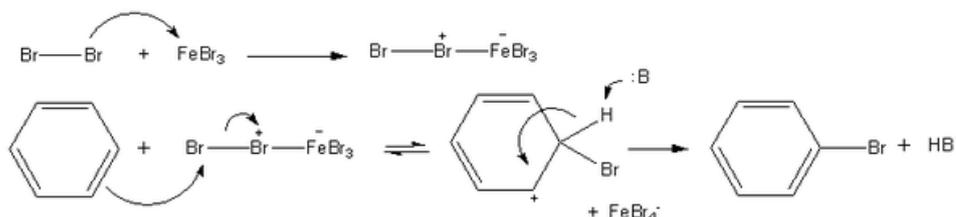


Figura 36. Mecanismo de la halogenación electrofílica aromática

Basándose en este tipo de reacción se desarrolló una patente para la síntesis de PBDEs que se lleva a cabo añadiendo un exceso de Br₂ sobre el medio de reacción al que se han incorporado el difenil éter y el catalizador y dejando que transcurra la reacción durante 5 h a temperatura ambiente.³ El mecanismo de esta reacción de síntesis es el que aparece en la *Figura 37*.

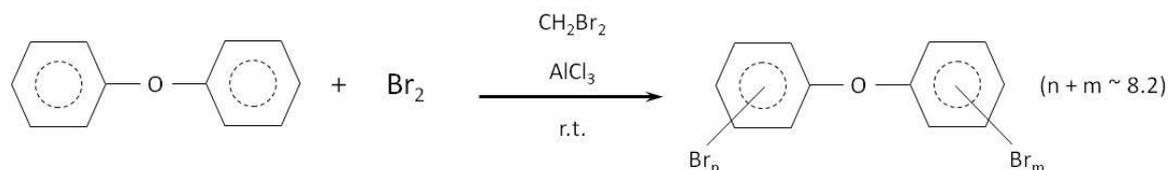


Figura 37. Mecanismo de síntesis de PBDEs

Este procedimiento de síntesis parece muy adecuado para la síntesis de los patrones marcados isotópicamente en ^{81}Br . Sin embargo, en la práctica, existen algunas limitaciones, ya que por un lado el reactivo marcado isotópicamente del que se dispone no es Br_2 , sino NaBr , que al ser una sal inorgánica presenta una estabilidad mucho mayor que Br_2 . Por otro lado esta reacción requiere la adición de un exceso de Br_2 , lo que en el caso de utilizar el reactivo marcado isotópicamente en ^{81}Br hace inviable este método de síntesis debido al elevado precio que presentan los reactivos marcados.

A la vista de las dificultades planteadas al seguir esta ruta de síntesis se buscaron en la bibliografía otras alternativas para la obtención de los PBDEs marcados. Existen escasas publicaciones directamente enfocadas a la obtención de patrones de PBDEs.⁴ El tipo de reacciones que se suelen emplear en estos casos no resultan, por lo general, demasiado sencillas y frecuentemente requieren de ciertos reactivos especiales que no suelen estar disponibles marcados isotópicamente en ^{81}Br . Además estas rutas sintéticas suelen estar diseñadas para la obtención de ciertos congéneres concretos que en la mayoría de las ocasiones no coinciden con los analitos de interés. Por tanto se descartó esta posibilidad y se retomó la idea de obtener los PBDEs a través de reacciones de halogenación de anillos aromáticos.

En primer lugar se intentó llevar a cabo la síntesis de PBDEs a través de la reacción de halogenación electrofílica descrita en la patente mencionada anteriormente.³ Como ya se ha comentado, al no disponer de Br_2 marcado isotópicamente en ^{81}Br fue necesario incluir una reacción previa de oxidación de Br^- con KMnO_4 en medio ácido para obtener Br_2 , que tras ser extraído con un disolvente orgánico se incorporó a una segunda reacción en la que se dejó reaccionar con difenil éter durante varias horas a temperatura ambiente y en presencia de un catalizador. Al contrario de lo que recomienda la patente, no se empleó un gran exceso de Br_2 en la halogenación, sino una relación en torno a 1:5-1:6 ($\text{Ph}_2\text{O}/\text{Br}_2$) para evitar un encarecimiento excesivo de los patrones marcados isotópicamente. Bajo estas condiciones generales de trabajo se probaron distintos disolventes para la extracción del Br_2 generado en la primera reacción así como distintos medios de reacción (hexano, CH_2Cl_2 y CCl_4), catalizadores (Fe , AlCl_3) y tiempos de reacción. En la *Figura 38* se muestran ejemplos de algunos de los resultados obtenidos al inyectar el crudo de la reacción de halogenación en un sistema de GC-(ICP)MS para distintas condiciones de trabajo. Como se puede observar al comparar cromatogramas obtenidos a distintas condiciones de trabajo con los

obtenidos para un patrón de PBDEs naturales que contiene una mezcla de los congéneres de interés (28, 47, 99, 100, 153, 154, 183) este procedimiento de síntesis no permitió obtener ningún PBDE.

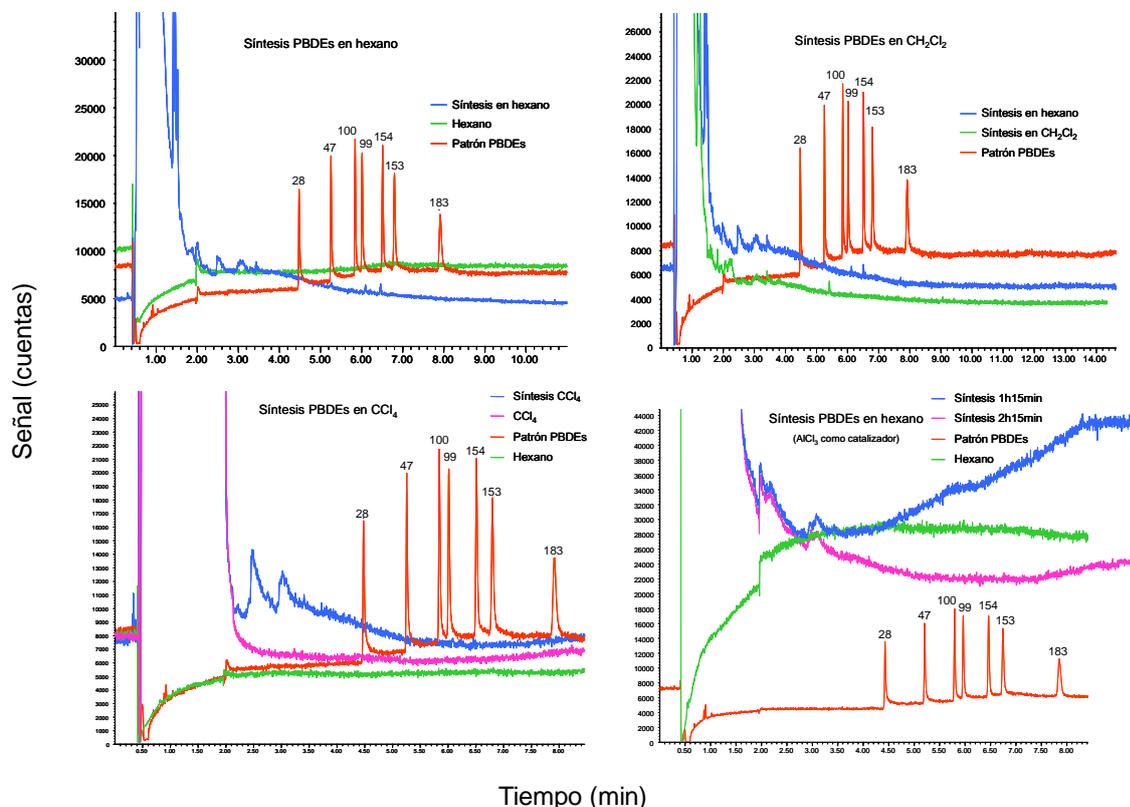


Figura 38. Cromatogramas de los crudos de reacción obtenidos mediante GC-(ICP)MS para distintas condiciones de trabajo

A la vista de los malos resultados obtenidos por esta vía se procedió a la búsqueda de nuevas alternativas para la síntesis de PBDEs. En la bibliografía se pueden encontrar algunas variantes de la sustitución electrofílica aromática para la incorporación de halógenos sobre anillos bencénicos. En concreto, la denominada *oxibromación* resulta de especial interés ya que utiliza como reactivo sales de Br⁻ y permite su oxidación *in situ* e incorporación sobre un anillo aromático en un único paso.⁵⁻⁷

La primera de las opciones que se evaluó se basó en un método para la bromación de anilinas y anisoles utilizando NH₄Br como reactivo para la bromación, H₂O₂ como agente oxidante y en un medio acético. La *Figura 39* muestra la reacción original descrita en la bibliografía así como su adaptación para la síntesis de PBDEs.

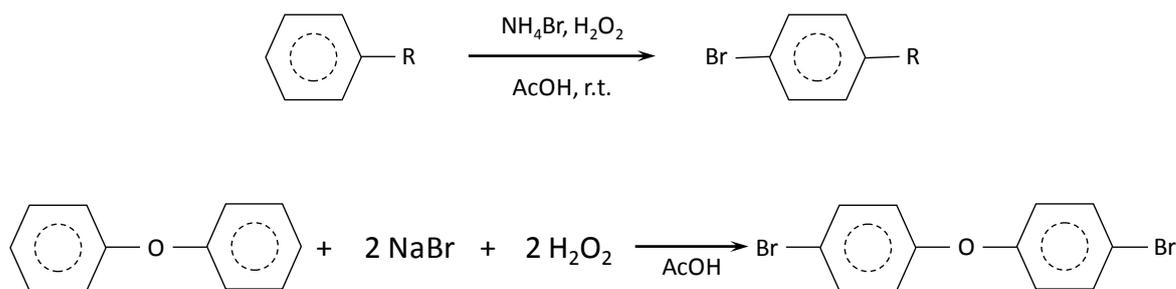


Figura 39. Esquema de reacción de oxibromación con H_2O_2

Cuando se utiliza difenil éter como sustrato habrá dos anillos aromáticos sobre los que se puede introducir el Br, por lo que duplicando la cantidad de reactivo bromado y de agente oxidante se puede introducir un átomo de bromo en cada anillo aromático. Puesto que los PBDEs de interés tienen entre 3 y 6 sustituyentes Br repartidos entre los dos anillos aromáticos se añadieron distintos excesos de Br y de agente oxidante con respecto del sustrato (relaciones Br/ Ph_2O 1:4, 1:10) para evaluar la posibilidad de alcanzar grados de bromación más altos. Sin embargo, en ninguna de las condiciones ensayadas se lograron grados de bromación superiores a dos. Por ello se pasó a evaluar la influencia que podían ejercer otros parámetros sobre la reacción. La *Tabla 40* recoge un resumen de todos los ensayos realizados.

Tabla 40. Condiciones de trabajo ensayadas para la obtención de PBDEs mediante una reacción de oxibromación con H_2O_2

- Cantidad de Br^- y H_2O_2 (relaciones $\text{Ph}_2\text{O}/\text{Br}^-$ y H_2O_2) \rightarrow 1:1, 1:2, 1:4 y 1:10
- Temperatura de reacción \rightarrow r.t., 50°C
- Cantidad de oxidante (relaciones $\text{Br}^-/\text{H}_2\text{O}_2$) \rightarrow 1:1, 1:2, 1:8
- Tipo de oxidante \rightarrow H_2O_2 , KMnO_4
- Catalizador \rightarrow \emptyset , Fe, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ⁸
- Medio de reacción \rightarrow CH_3COOH , H_2O , CH_3OH , CH_3CN ⁹
- Adiciones consecutivas de oxidante \rightarrow hasta 8 horas
- Tiempo de reacción \rightarrow hasta 6 días

Además de aumentar la proporción de Br presente en el medio, también se intentó favorecer la reacción aumentando la temperatura. Por otro lado se pensó que el H_2O_2 empleado como agente oxidante podía presentar cierta inestabilidad y descomponerse

bajo la acción de la luz natural, por lo que se probaron otros agentes oxidantes alternativos. Además, en aquellos casos en los que se utilizó H_2O_2 como agente oxidante se trabajó con un exceso del mismo de modo que se fue incorporando sobre el medio de reacción mediante adiciones consecutivas con el fin de intentar compensar las posibles pérdidas que pudieran tener lugar debido a la degradación del oxidante. También se estudió la posibilidad de trabajar con otros catalizadores y se probaron distintos medios y distintos tiempos de reacción. Los mejores resultados se obtuvieron utilizando H_2O_2 como oxidante en una adición única y en la misma proporción que Br^- (Br^-/H_2O_2 1:1), con $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ como catalizador. El medio de reacción más adecuado resultó ser CH_3COOH y la reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente utilizando un exceso de Br^- sobre la cantidad de sustrato (Br^-/Ph_2O 1:10). La *Figura 40* muestra el cromatograma del crudo de reacción obtenido mediante GC-(ICP)MS para estas condiciones de trabajo. Los resultados fueron confirmados mediante GC-(EI)MS.

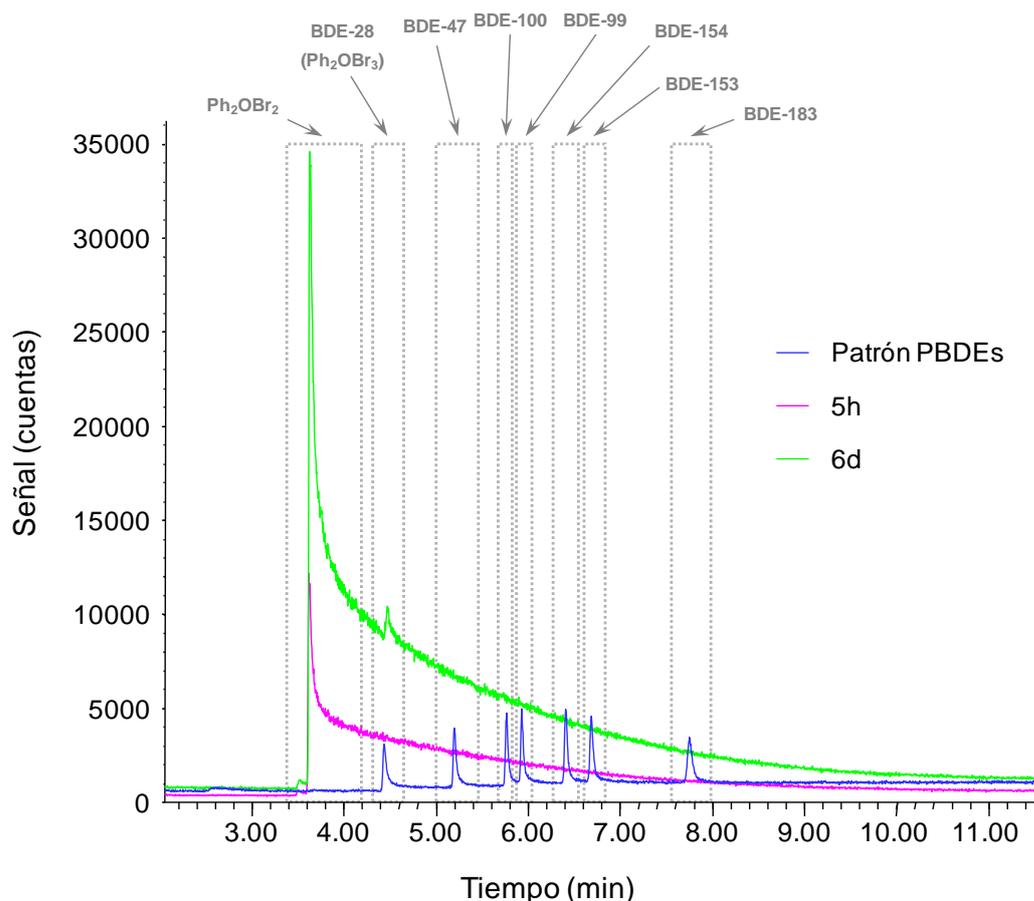


Figura 40. Cromatograma obtenido por GC-(ICP)MS para el crudo de la reacción de síntesis de oxibromación con H_2O_2 como agente oxidante

Como se puede observar en ninguno de los casos se logró alcanzar un grado de bromación superior a tres por lo que también se descartó la síntesis por oxibromación con H_2O_2 .

Por último se planteó la posibilidad de utilizar el oxone como agente oxidante, que a pesar de no ser tan utilizado como H_2O_2 o KMnO_4 presenta un alto potencial de oxidación (Ecuación 44) lo que permite llevar a cabo gran variedad de reacciones de oxidación a temperatura ambiente, como la transformación de haluros en halógenos.



Además, este oxidante es estable, fácil de manipular, no es tóxico y resulta bastante barato.¹⁰ Se trata de una sal triple de potasio ($2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$), con monopersulfato potásico como componente activo ya que es capaz de oxidar *in situ* Br (KBr o NH_4Br) e incorporándolo al anillo aromático a través de una sustitución electrofílica.^{5,7} La Figura 41 muestra la reacción original descrita en la bibliografía así como su adaptación para la síntesis de PBDEs.

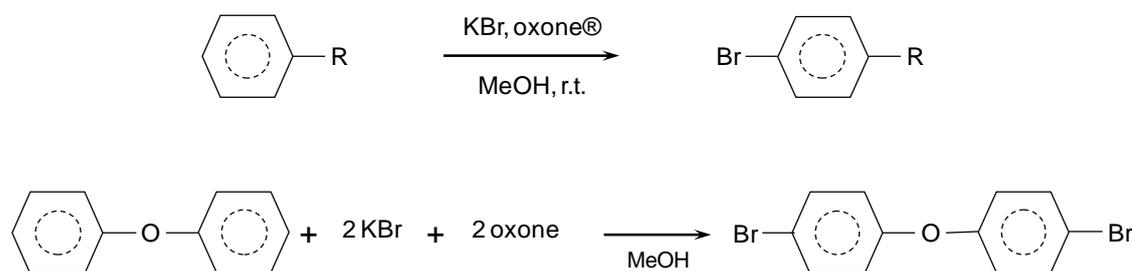


Figura 41. Esquema de reacción de oxibromación con oxone

Como ocurría cuando se empleaba H_2O_2 como oxidante, cuando la relación $\text{Ph}_2\text{O}/\text{Br}$ es 1:2 sólo es posible introducir dos sustituyentes, uno en cada anillo aromático, por lo que, al igual que en la oxibromación con H_2O_2 se variaron las condiciones de reacción según se muestra en la Tabla 41.

Tabla 41. Condiciones de trabajo ensayadas para la obtención de PBDEs mediante una reacción de oxibromación con oxone

- Cantidad de Br⁻ y H₂O₂ (relaciones Ph₂O/Br⁻/oxone) → 1:2:2 y 1:10:10
- Temperatura de reacción → 40°C - 50°C
- Medio de reacción → CH₃OH, CH₃CN, H₂O
- Volumen de disolvente → 1,25 mL -10 mL
- Catalizador → AlCl₃
- Tiempo de reacción → hasta 8 días

Los mejores resultados se obtuvieron utilizando un exceso de Br⁻ sobre la cantidad de sustrato (10:1, Br⁻/Ph₂O) e igual cantidad de oxidante (1:1, Br⁻/oxone). El medio de reacción más adecuado fue H₂O (4 mL) y se observó una mayor evolución de la reacción al aumentar la temperatura y el tiempo. En estas condiciones de trabajo se obtuvo el cromatograma (GC-(EI)MS) que se muestra en la *Figura 42*.

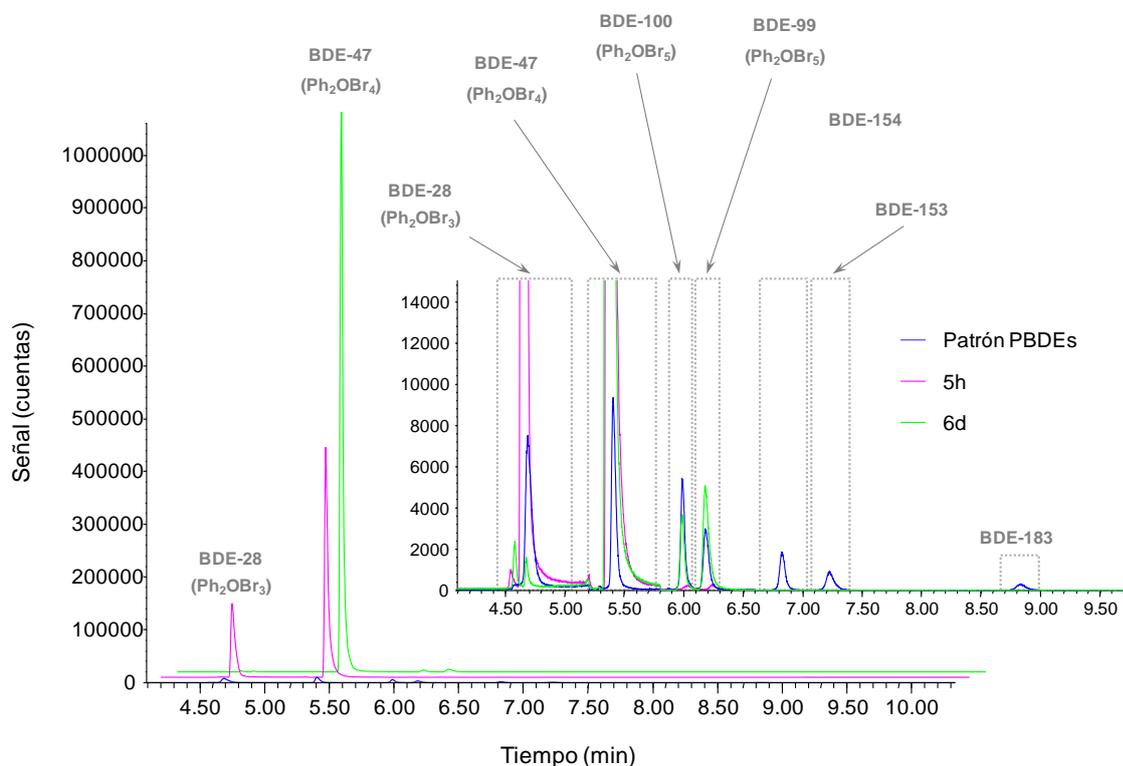


Figura 42. Cromatograma obtenido por GC-(EI)MS para el crudo de la reacción de síntesis de oxibromación con oxone como agente oxidante

Como se puede ver este oxidante parece ser más efectivo que los probados anteriormente ya que en tan solo 5 horas se lograron incorporar entre 3 y 4 átomos de Br sobre los anillos aromáticos y tras 6 días de reacción se pueden obtener pequeñas cantidades de alguno de los congéneres penta. Cabe destacar que a pesar de que el mecanismo propuesto para esta reacción tiene lugar a través de la formación del ion Br^+ que se incorpora directamente sobre el anillo aromático, en la práctica lo que se observa es la formación de Br_2 (disolución de color rojo) que en una segunda etapa se incorpora sobre el anillo aromático, por lo que se pensó que la presencia de AlCl_3 como catalizador podría favorecer la reacción. Sin embargo, su uso no aportó ninguna ventaja sobre la reacción llevada a cabo sin catalizador. Esto puede ser así debido a que este catalizador se utiliza para la reacción de halogenación electrofílica aromática, que tiene lugar en un medio de reacción de naturaleza orgánica (CH_2Cl_2) y su acción se elimina una vez completada la reacción mediante la adición de H_2O , por lo que puede que no resulte efectivo cuando se trabaja en medio acuoso.

A la vista de estos resultados se decidió llevar a cabo la reacción en dos etapas, una primera en la que se genera Br_2 a partir de Br^- utilizando oxone como agente oxidante y extracción con CH_2Cl_2 que constituye el medio de reacción de la segunda etapa. Sobre el Br_2 generado y extraído en CH_2Cl_2 se añade el sustrato (Ph_2O) y el catalizador (AlCl_3). En estas condiciones y siguiendo el procedimiento descrito en la sección C.3.1.2 se logró alcanzar grados de bromación más altos, dependientes de la relación $\text{Br}_2/\text{Ph}_2\text{O}$ utilizada en cada caso. La *Figura 43* muestra algunos ejemplos de los resultados obtenidos para distintas relaciones entre el reactivo y el sustrato. Siguiendo este procedimiento fue posible obtener la mezcla de PBDEs marcados isotópicamente en ^{81}Br que se indican en el artículo científico incluido en la sección D.2.3.1.

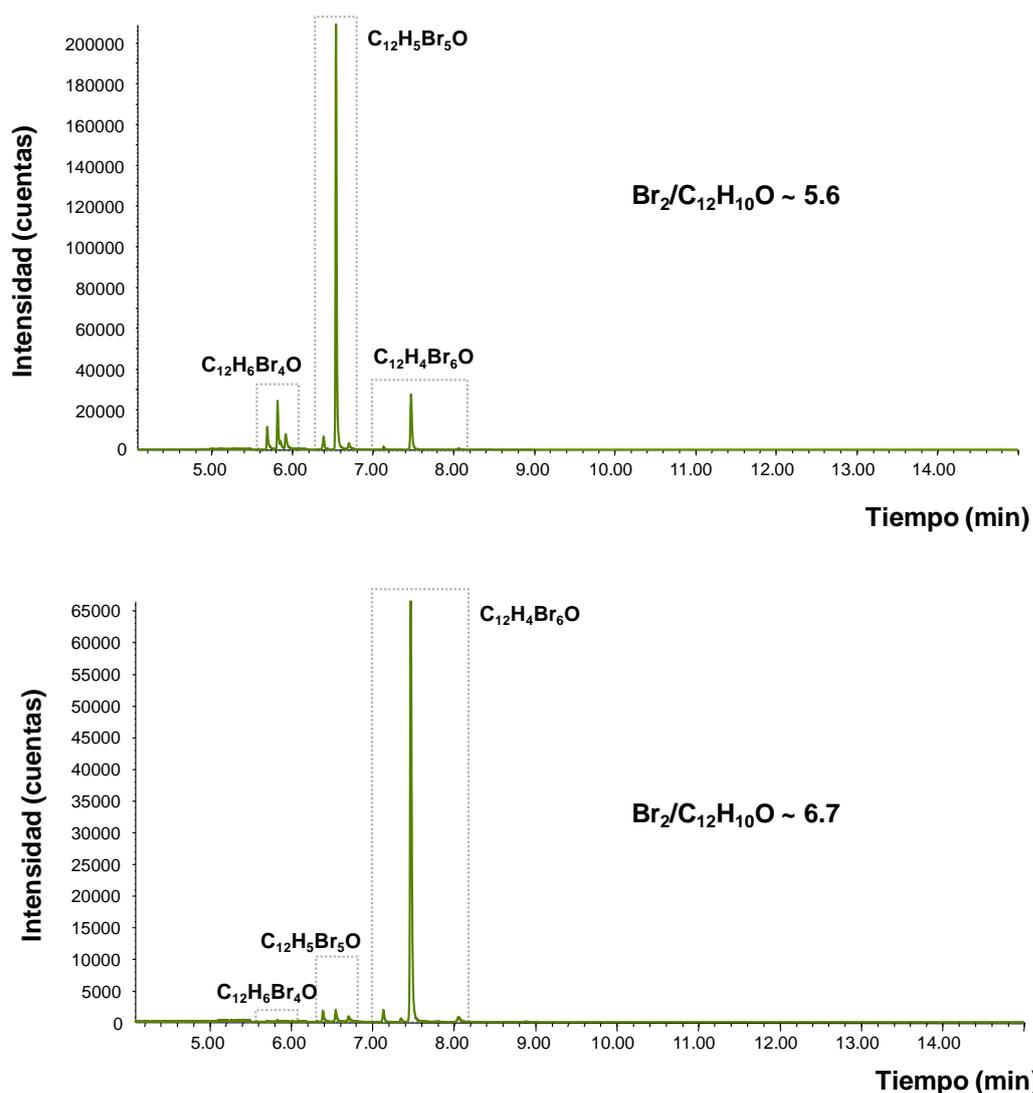


Figura 43. Influencia de la relación $\text{Br}_2/\text{Ph}_2\text{O}$ sobre el grado de bromación de los productos obtenidos mediante la reacción de halogenación en dos pasos con oxone como agente oxidante

D.2.4.2 Identificación de los compuestos sintetizados marcados isotópicamente en

^{81}Br

La identificación de los compuestos marcados se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención de los compuestos marcados isotópicamente con patrón mezcla de congéneres naturales. La Figura 44 muestra superpuestos los cromatogramas obtenidos mediante CG-(NCI)-MS para el crudo de la reacción de síntesis y para una mezcla de congéneres naturales. Los congéneres presentes tanto en el crudo de la reacción como en la mezcla de compuestos naturales son los que aparecen resaltados en negrita.

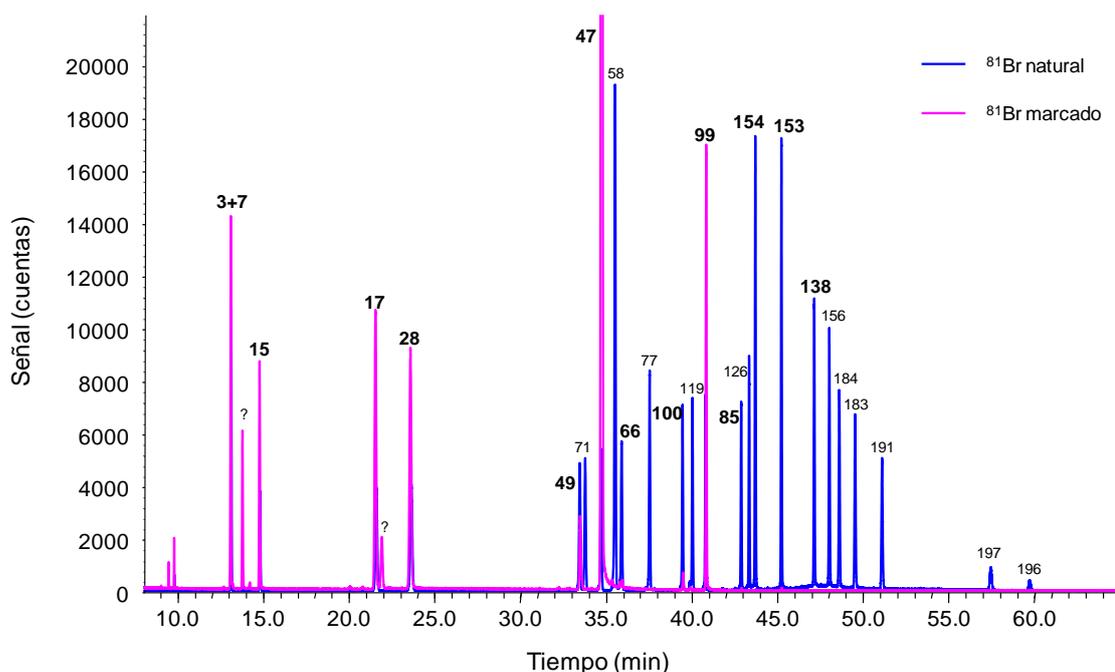


Figura 44. Identificación de los compuestos sintetizados marcados isotópicamente por comparación de tiempos de retención

Para los congéneres considerados prioritarios según la WFD (28, 47, 99, 100, 153 y 154) se compararon además los tiempos de retención de los compuestos marcados con los de sus análogos naturales inyectados individualmente, lo que permitió definir inequívocamente el orden de elución de los mismos

Por último, se confirmó el grado de bromación de los congéneres marcados a través de sus correspondientes espectros de masas obtenidos mediante GC-(EI)MS. Para ello se compararon los perfiles isotópicos obtenidos experimentalmente para los principales fragmentos moleculares de cada compuesto (M^+ y $M-2Br^+$) con los obtenidos teóricamente mediante el programa de cálculo descrito en la sección C.3.2.2.2. La *Figura 45* muestra un ejemplo del ajuste entre los datos teóricos y los experimentales para el congénere BDE-28 perteneciente al grupo homólogo de los congéneres con grado de bromación 3.

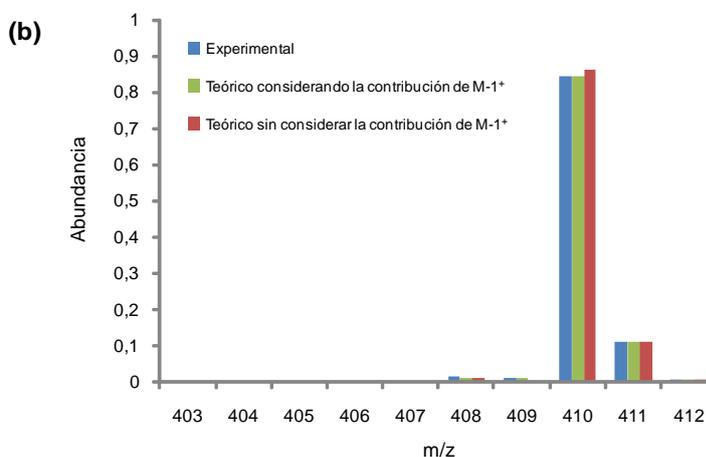
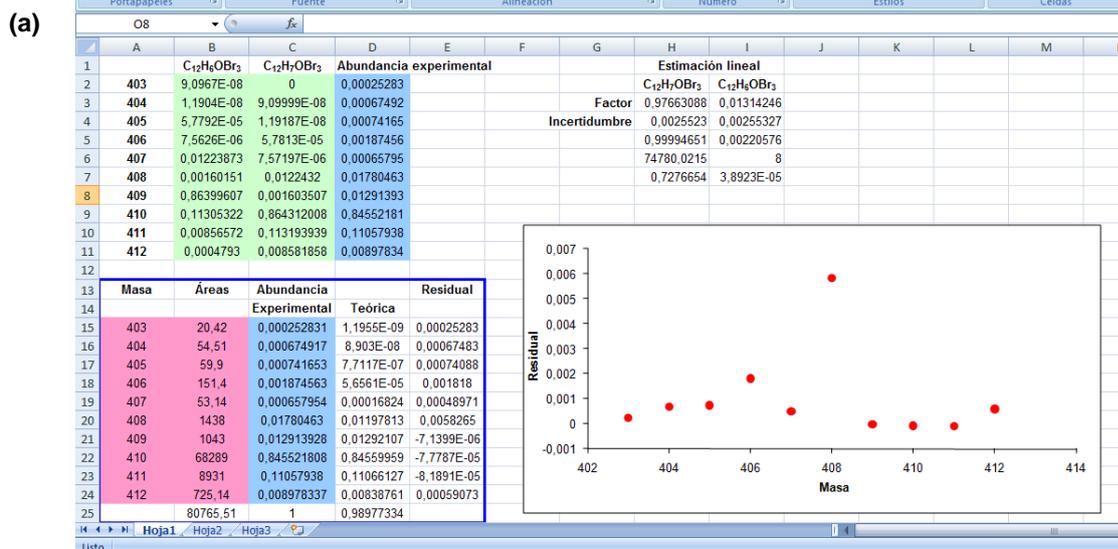


Figura 45. Confirmación del grado de bromación por comparación de datos teóricos y experimentales para el fragmento M⁺ de un compuesto de fórmula molecular C₁₂H₇OBr₃

(a) Valores residuales del ajuste (b) Comparación de perfiles isotópicos

D.2.5 Referencias

- ¹ F. Rahman, K. H. Langford, M. D. Scrimshaw, J. N. Lester. **Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants.** *Sci. Tot. Environ.*, 2001, 275, 1-17.
- ² C. A. de Wit. **An overview of brominated flame retardants in the environment.** *Chemosphere*, 2002, 46, 583-624.
- ³ R. Decaudin, B. Gurtner, A. Gagnieur. **Process for the preparation of brominated derivatives of diphenyl ether.** United States Patent (4.701.564).
- ⁴ H. Liu, M. Bernhardsen, A. Fiksdahl. **Polybrominated diphenyl ethers (BDEs); preparation of reference standards and fluorinated internal analytical standards.** *Tetrahedron*, 62, 2006, 3564-3572.
- ⁵ N. Narender, P. Srinivasu, M. Ramakrishna Prasad, S. J. Kulkarni, K. V. Raghavan. **An efficient and regioselective oxybromination of aromatic compounds using potassium bromide and oxone®.** *Synthetic Commun.*, 32(15), 2002, 2313-2318.
- ⁶ K. V. V. Krishna Mohan, N. Narender, P. Srinivasu, S. J. Kulkarni, V. Raghavan. **Novel bromination method for anilines and anisoles using NH₄Br/H₂O₂ in CH₃COOH.** *Synthetic Commun.*, 34(12), 2004, 2143-2152.
- ⁷ M. A. Kumar, C. N. Rohitha, S. J. Kulkarni, N. Narender. **Bromination of aromatic compounds using ammonium bromide and oxone®.** *Synthesis*, 2010, 10, 1629-1632.
- ⁸ V. Conte, B. Floris, P. Galloni, A. Silvagni. **Oxybromination of ethynylbenzene catalysed by molybdenum complexes in organic solvent and in ionic liquids.** *Adv. Synth. Catal.*, 2005, 347 (10), 1341-1344.
- ⁹ S. H. Johnson, R. Q. Brewster. **The bromination of phenol and the cresols in various solvents.** *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 1950, 53(3), 398-403.
- ¹⁰ B. R. Travis, M. Sivakumar, G. O. Hollist, B. Borhan. **Facile oxidation of aldehydes to acids and esters with oxone.** *Org. Lett.*, 2003, 5 (7), 1031-1034.

**D.3 DETERMINACIÓN DE DIFENIL ÉTERES
POLIBROMADOS PRIORITARIOS EN MUESTRAS DE
INTERÉS MEDIOAMBIENTAL MEDIANTE DISTINTAS
METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS POR DILUCIÓN
ISOTÓPICA**

Artículo científico III. Adriana González-Gago, Juan Manuel Marchante-Gayón, José Ignacio García Alonso

Determination of priority Polybrominated Diphenyl Ethers by isotope dilution
Gas Chromatography(Electron Ionization)MS using ^{81}Br -labeled standards

Anal. Chem., 2011, 83, 3024-3032

Artículo científico IV. Adriana González-Gago, Sicco H. Brandsma, Pim E. G. Leonards, Jacob de Boer, Juan Manuel Marchante-Gayón, José Ignacio García Alonso

Determination of ultra-trace levels of priority PBDEs in water samples by
isotope dilution GC(ECNI)MS using ^{81}Br -labelled standards

Anal. Bioanal. Chem., 2011, 401, 2639-2649

D.3.1 Introducción

La creciente preocupación sobre los efectos adversos que pueden provocar los PBDEs sobre los seres vivos y el medioambiente ha llevado a distintos organismos oficiales de todo el mundo a tomar ciertas medidas para el control de estas sustancias que garanticen la protección de la salud pública y la conservación del medioambiente.

La WFD es, hasta la fecha, la única normativa que, a través de la Directiva EQS, propone valores máximos admisibles para la presencia de ciertos PBDEs considerados como prioritarios (28, 47, 99, 100, 153 y 154) en aguas. Debido a sus características fisicoquímicas los PBDEs suelen encontrarse a niveles de concentración muy bajos en el agua, por lo que los métodos empleados para su determinación deben proporcionar muy bajos LDs así como una buena exactitud y precisión para garantizar la fiabilidad de los resultados. Los métodos de análisis desarrollados hasta el momento para la determinación de PBDEs no alcanzan los requisitos mínimos establecidos por la legislación vigente.

Por otra parte, la baja solubilidad en agua de los PBDEs favorece su transferencia a otras matrices de naturales más hidrofóbica como los sedimentos o el material en suspensión y sobre todo su bioacumulación en organismos vivos. Por ello la Directiva EQS sugiere a los Estados Miembros la monitorización de los PBDEs en este tipo de matrices para una mejor valoración del estado químico de las aguas, por lo que también será necesario desarrollar metodologías para la determinación de PBDEs en muestras sólidas que, aunque por lo general contienen niveles de concentración más elevados que las muestras de agua, presentan matrices mucho más complejas, por lo que será necesario someter a las muestras a los procedimientos de limpieza y fraccionamiento que eliminen los posibles interferentes que puedan afectar a la señal del analito, siendo además recomendable el uso de detectores selectivos que permitan discriminar la señal generada por los interferentes frente a la de los analitos.

La MS es una técnica que resulta muy adecuada para la determinación de PBDEs ya que puede cubrir todas estas necesidades (sensibilidad y selectividad) en función del tipo de fuente de ionización y analizador de masas que se seleccione para llevar a cabo la determinación. Además, la MS en combinación con la estrategia de marcaje con heteroátomos permite el desarrollo de metodologías basadas en IDA en modo

específico, que destacan en el campo de la química analítica al considerarse como métodos de referencia o absolutos que proporcionan resultados directamente trazables al Sistema Internacional de Unidades. Los métodos de IDA específico resultan de especial interés para la determinación de PBDEs en muestras de origen biológico y medioambiental ya que permiten por un lado obtener una gran exactitud y precisión en los resultados, incluso cuando se pretenden determinar a bajos niveles de concentración y por otro lado corregir los posibles errores (perdidas de analito, dilución o preconcentración de la muestra) que pueden tener lugar al someter a la muestra a las etapas necesarias de extracción, limpieza y fraccionamiento previas a la etapa de medida.

D.3.2 Objetivos

Teniendo en cuenta todo lo expuesto en la introducción, el objetivo principal de este capítulo es el desarrollo de nuevas metodologías basadas en IDA específico con detección por MS para el control de PBDEs en muestras de interés medioambiental.

Este objetivo principal fue abordado a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Preparación de un trazador aplicable a la determinación de los PBDEs prioritarios en distintos tipos de muestras. Este objetivo parcial requiere el desarrollo de una serie de pasos concretos que se detallan a continuación.
 - Optimización de las condiciones de separación cromatográfica de los congéneres sintetizados mediante LC y detección mediante DAD.
 - Recogida de la fracción correspondiente a cada congénera y confirmación de su identidad mediante GC-(EI)MS.
 - Preparación de un trazador que contenga los PBDEs considerados prioritarios con un perfil de concentraciones semejante al que presentan en muestras de origen biológico y medioambiental.
2. Caracterización del trazador en concentración y en distribución de isotómeros de masa mediante GC-(EI)MS para su uso en IDA molecular.
3. Estudio de la posible contaminación del trazador con PBDEs de abundancias isotópicas naturales a través de la comparación de perfiles isotópicos de los

fragmentos moleculares obtenidos mediante GC-(EI)MS y evaluación de su contribución en el trazador mediante IPD.

4. Estudio de la estabilidad temporal en la concentración del trazador y frente al intercambio isotópico en una mezcla de congéneres análogos naturales y marcados isotópicamente.
5. Desarrollo y validación de una metodología para la determinación de PBDEs prioritarios en una muestra de pescado (SRM 1947 *Lake Michigan Fish Tissue*) mediante IDA molecular GC-(EI)MS utilizando un trazador que contiene los congéneres prioritarios marcados isotópicamente en ^{81}Br .
6. Evaluación de las características de la fuente de NCI para la medida de relaciones isotópicas de Br para su posterior aplicación a la determinación de PBDEs en muestras de interés medioambiental mediante IDA elemental.
7. Caracterización del trazador en concentración y en abundancias isotópicas mediante GC-(NCI)MS. Comparación de los resultados con los obtenidos mediante GC-(EI)MS y con las abundancias isotópicas obtenidas mediante GC-(ICP)MS para el crudo de reacción.
8. Desarrollo y validación de una metodología de IDA elemental para la determinación de PBDEs prioritarios en una muestra de pescado (SRM 1947 *Lake Michigan Fish Tissue*) mediante el sistema GC-(NCI)MS, utilizando como trazador una mezcla de los congéneres prioritarios marcados isotópicamente en ^{81}Br .
9. Desarrollo y validación de una metodología para la determinación de PBDEs prioritarios a niveles de ultratrazas en agua mediante IDA elemental GC-(NCI)MS, utilizando como trazador una mezcla de los congéneres prioritarios marcados isotópicamente en ^{81}Br .
10. Aplicación de la metodología desarrollada a la determinación de los PBDEs prioritarios en agua de río.

D.3.3 Resultados

D.3.3.1 Artículo científico III: *J. Anal. Chem.*, 2011, 83, 3024–3032analytical
chemistry

ARTICLE

pubs.acs.org/ac

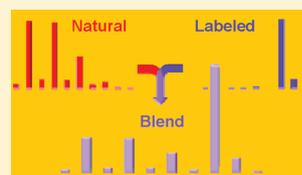
Determination of Priority Polybrominated Diphenyl Ethers by Isotope Dilution Gas Chromatography(Electron Ionization)MS Using ^{81}Br -Labeled Standards

Adriana González-Gago, Juan Manuel Marchante-Gayón, and J. Ignacio García Alonso*

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: A mixture of ^{81}Br -labeled polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), previously synthesized in our laboratory, was separated by liquid chromatography for the individual isolation of different ^{81}Br -labeled PBDEs containing from 3 to 6 bromine atoms. The different fractions were collected, and a mixed labeled standard was then prepared adequate for the determination of priority PBDEs (congeners 28, 47, 99, 100, 153, and 154) in environmental samples. The spike mixture was then characterized using gas chromatography(electron ionization)MS (GC(EI)MS) both in isotope composition and concentration in combination with multiple least-squares. Contamination from natural abundance BDEs 153 and 154 was detected in the spike mixture, and a new isotope dilution equation was developed to take into account the natural abundance contribution from the spike. The spike mixture was shown to be stable during at least 4 months, and no isotope exchange between natural abundance and labeled PBDEs was detected during this period of time. Finally, the ^{81}Br -labeled PBDEs standard was used for the determination of congeners 28 (+33), 47, 49, 99, 100, 153, and 154 in a standard reference material (Lake Michigan fish tissue SRM 1947) using three different sample to spike ratios. No methodological calibration needed to be prepared, as no isotopic effects were detected using this labeling mode. Concentrations found were in agreement with the certified concentrations (recoveries between 89% and 116%), and reproducibility was always below 7% RSD. Kragten procedure was used to calculate expanded uncertainties. Very low limits of detection were obtained for all compounds (between 0.02 and 0.9 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) using the procedure developed here.



The general expression “brominated flame retardants” (BFRs) refers to a group of bromine containing organic compounds which are employed as additives in polymers to inhibit combustion processes.^{1,2} From this group, polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are some of the most widely used BFRs. These flame retardants are not chemically bound to the polymers^{3,4} and, therefore, PBDEs can be easily released into the environment. Several release routes have been described such as volatilization or dust formation from polymers and emissions during manufacture, waste disposal, or the recycling of PBDE-containing products.⁵ Thus, PBDEs are nowadays widely spread in the environment. As a result, these compounds have been detected in air, sediments, sludge, and soils as well as indoor air, house dust, and even in foodstuffs.^{6,7} They have also been found in living organisms such as birds, fish, terrestrial animals, and humans (adipose tissue, serum, and breast milk).⁵ This wide distribution of PBDEs in the environment has raised concerns about the potential risks of PBDE exposure to human health. PBDEs show high lipophilicity;⁴ they are resistant to chemical and biological degradation⁸ and possess high bioaccumulation and biomagnification potential.⁹ Some toxicological studies suggest that they are linked to adverse physiological effects.¹⁰ Consequently, new regulations about the control of those compounds in environmental samples have been published.¹¹ For example, the European Water Framework Directive requires the determination of

priority BDEs (congeners 28, 47, 99, 100, 153, and 154) in continental waters¹¹ at levels below 0.5 ng L^{-1} . It is clear that, for routine analysis of PBDEs, further improvements in the determination techniques are still needed if we are to meet the analytical requirements.¹²

Analytical methods employed for the determination of PBDEs in biological and environmental samples are very similar to those employed for PCBs.¹³ These methodologies require a complex sample preparation procedure which usually involves several steps such as drying of solid samples followed by extraction of the analytes from the sample matrix with organic solvents and, finally, the clean up and fractionation of the organic extracts.¹² The techniques most widely used for the determination of PBDEs are gas chromatography (GC) coupled to a halogen specific detector such as electron capture (ECD) or, more often, mass spectrometry (MS) either in negative chemical ionization (NCI) or in positive electron ionization (EI) modes.¹⁴ Recently, the inductively coupled plasma (ICP) source has been proposed also for the determination of PBDEs with very low detection limits.¹⁵ To correct for losses during the sample preparation steps, commercially available $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled analogues are usually

Received: December 7, 2010

Accepted: March 4, 2011

Published: March 17, 2011

selected as internal standards in combination with isotope dilution mass spectrometry (IDMS). Unfortunately, the use of these labeled standards limits the choice of the ion source. Only electron ionization can be employed¹² since the higher sensitive NCI¹⁴ or ICP¹⁵ sources typically produce monatomic negative or positive Br ions ($m/z = 79$ and 81) which do not allow the discrimination between the analyte and the ¹³C-labeled internal standards.¹⁶

Recently, we have synthesized a series of ⁸¹Br-labeled PBDEs which would allow the use of any of these three different ionization sources for their determination by IDMS. In that work,¹⁷ the main congeners obtained in the crude product were BDEs 28, 47, and 99, and they were characterized in concentration and isotopic composition both by gas chromatography (electron ionization) MS (GC(EI)MS) and GC(ICP)MS. Finally, a calibration-free IDMS procedure based on multiple linear regression¹⁸ was developed and applied to the determination of congeners 28, 47, and 99 in spiked water samples at ng L⁻¹ levels. The crude synthetic mixture used previously¹⁷ showed also detectable amounts of other BDEs such as 49, 100, 153, and 154 but in a very low concentration level. It is clear that, for IDMS calculations, the concentration ratio between analyte and spike should be within certain limits to minimize error propagation.¹⁹ That means that we need to prepare a new PBDE mixture with similar concentration levels for all PBDEs for the simultaneous determination of all priority congeners¹¹ in environmental samples.

Consequently, this work focused on the isolation of the different ⁸¹Br-labeled congeners from the crude synthetic mixture by liquid chromatography. Then, an appropriate mixture was prepared and characterized and, finally, an analytical IDMS procedure was developed and validated using a Lake Michigan fish tissue reference material (SRM 1947). GC(EI)MS was used in this work as this source, unlike higher sensitive NCI and ICP, provides information of molecular clusters, which allows the study of isotope exchange reactions. This study must be carried out in order to evaluate the suitability of the ⁸¹Br-labeled standard for IDMS experiments using any of the mentioned ionization sources. Particular attention was paid to the application of IDMS procedures which do not require the construction of a methodological calibration graph¹⁸ and could be suitable for routine analysis of these priority pollutants.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents and Materials. Individual certified standards of 6 BDEs (congeners 28, 47, 99, 100, 153, and 154, 50 μg mL⁻¹ in nonane) were obtained from Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, USA). The tetrabrominated ¹³C₁₂-BDE 47 (99% isotopic purity, 50 μg mL⁻¹ in nonane) was also obtained from Cambridge Isotope Laboratories. Reference materials SRM 1947 (Lake Michigan Fish Tissue) and SRM 2257 (PBDE congener mixture in 2,2,4-trimethylpentane) were both obtained from the National Institute of Standards and Technology (NIST).

All solvents used in this work were of the highest purity. Acetone, methanol, and hexane were purchased from Fluka (Steinheim, Germany), and dichloromethane and diethyl ether were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Gradient A10 water purification system (Millipore S.A.S, Molsheim, France). Working standard solutions of labeled and unlabeled PBDEs and SRM

Table 1. GC(EI)MS Operating Conditions

GC and Interface Parameters	
Column	DB-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)
Injection mode	Pulsed splitless
Splitless time	2 min
Pulse	30 psi, 1 min
Injection volume	2 μL
Carrier gas/Flow	He/constant flow 2 mL · min ⁻¹
Injection temperature	290 °C
Oven program	90 °C (2 min) to 200 °C at 30 °C min ⁻¹ to 255 °C at 1.5 °C min ⁻¹ and to 300 °C (10 min) at 30 °C min ⁻¹
Interface temperature	280 °C
EI Ion Source and MS Parameters	
Source temperature	230 °C
Analyzer temperature	150 °C
Acquisition mode	SIM
Dwell time	20 ms
Solvent delay	3.5 min

2257 were prepared in isooctane (Sigma-Aldrich) and stored in the dark at 4 °C until use. All dilutions were performed on a weight basis.

All glassware used for the sample preparation was cleaned with detergent (Mucosol from Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Germany), rinsed with Milli-Q water, dried in an oven, and brought to room temperature. Then, it was rinsed twice with hexane and acetone and allowed to dry at room temperature just before its use. Anhydrous sodium sulfate (Merck, Darmstadt, Germany) was used to dry the samples, and silica gel (0.063–0.200 mm) for column chromatography (Merck) was used in the clean up and fractionation steps during sample preparation.

Instrumentation. A HPLC model 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) has been used in this work for the purification of PBDEs. The system consisted of a four-channel online degasser, a standard binary pump, a micro well-plate autosampler, a thermostatted column compartment, and a UV–vis (190–700 nm) diode array detector (DAD). Solutions (20 μL) of the crude synthetic mixture were injected automatically in a Zorbax Eclipse XDB-C18 separation column (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

A GC model 6890N (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) fitted with a split/splitless injector and equipped with a MSD model 5975B (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) has been used for the analytical work. Solutions (2 μL) were injected automatically by an autosampler model 7683 (Agilent). The chromatographic separation was carried out using a low polarity capillary column DB-5MS Ultra Inert (J&W Scientific, Folsom, CA, USA; 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness), as it has been one of the most used and tested for PBDEs.¹² Operating conditions are summarized in Table 1.

All standard solutions and mixtures were prepared gravimetrically using an analytical balance model AB204-S (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Switzerland).

Procedures. PBDEs Purification. For the separation of each PBDE present in the synthesis crude product,¹⁷ the original solvent (dichloromethane) was evaporated to dryness and the residue was redissolved in acetone. Finally, 20 μL of the mixture dissolved in acetone was injected into the HPLC system. The mobile phase consisted of 92% methanol/8% water in isocratic mode at a flow rate of 1 mL min^{-1} . Six fractions were manually collected in different amber glass vials. Then, each fraction was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen and redissolved in isooctane. The separation procedure was repeated as many times as necessary to get a sufficient amount of each BDE congener for future work. Finally, the solutions containing individual ^{81}Br -labeled congeners were preconcentrated under nitrogen to a final volume of ca. 1 mL, and 2 μL of each solution was injected in the GC(EI)MS to check the purity of each fraction.

Characterization of ^{81}Br -Labeled PBDEs. The isotopic composition of bromine in the ^{81}Br -labeled PBDEs synthetic mixture had been previously determined by GC(ICP)MS monitoring both m/z 79 and 81 and using a mixture of natural abundance PBDEs for mass bias correction.¹⁷ The isotopic composition of the purified congeners was now evaluated again by GC(EI)MS using a multiple least-squares procedure.

The concentrations of the congeners 28, 47, 49, 99, 100, 153, and 154 in the new ^{81}Br -labeled mixture were determined by reverse isotope dilution analysis using the certified reference material SRM 2257 (certified PBDEs mixture) as standard. To do that, a mixture of the SRM 2257 and the labeled standard was prepared and injected in the GC(EI)MS system and the concentrations were calculated by the isotope pattern deconvolution procedure described previously.¹⁷

Determination of PBDEs in Fish Tissue SRM 1947. Samples of Lake Michigan fish tissue (SRM 1947) were prepared following a previously described sample preparation procedure²⁰ with some modifications. Homogenized fish tissue was ground in a mortar with anhydrous sodium sulfate and allowed to dry for 3 h. Then, the samples were spiked with an appropriated amount of the ^{81}Br -labeled PBDEs standard. After that, the PBDEs were extracted using a Soxhlet system for 12 h with hexane/acetone (3:1, v/v). The extract was concentrated, cleaned up on acidic silica gel columns (40% H_2SO_4), and eluted with dichloromethane/hexane (3/7, v/v). The collected fraction was concentrated under nitrogen and eluted over a second fractionation silica gel column (2% H_2O) with hexane, hexane/diethyl ether (85/15, v/v), and diethyl ether. Samples were then evaporated under nitrogen to a few microliters and injected in the GC(EI)MS system.

IDMS Procedure. The concentrations of the different BDE congeners were calculated by the isotope pattern deconvolution procedure described previously.¹⁷ In brief, the peak areas corresponding to $n = 5$ selected masses for each compound were measured in SIM mode. Then, the isotope abundances for each mass in the mixture, A_{mix}^i were calculated by dividing each peak area by the sum of all peak areas for each compound. The molar fractions of natural and labeled BDEs, X_{nat} and X_{lab} , were calculated by multiple least-squares from the equation:

$$\begin{bmatrix} A_{\text{mix}}^1 \\ A_{\text{mix}}^2 \\ \dots \\ A_{\text{mix}}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{\text{nat}}^1 & A_{\text{lab}}^1 \\ A_{\text{nat}}^2 & A_{\text{lab}}^2 \\ \dots & \dots \\ A_{\text{nat}}^n & A_{\text{lab}}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{\text{nat}} \\ X_{\text{lab}} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ \dots \\ e^n \end{bmatrix}$$

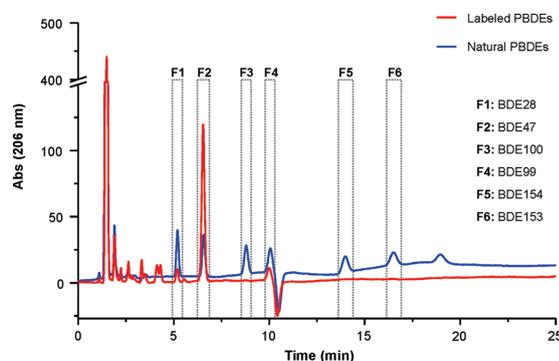


Figure 1. HPLC chromatograms for a natural abundance PBDE standard (containing BDEs 28, 47, 99, 100, 153, 154, and 183) and the ^{81}Br -labeled mixture showing the six fractions collected.

Where the isotope composition of the natural and labeled PBDEs, A_{nat}^i and A_{lab}^i , are known. Finally, the number of mols of natural abundance BDEs can be calculated using:

$$\frac{N_{\text{nat}}}{N_{\text{lab}}} = \frac{X_{\text{nat}}}{X_{\text{lab}}} \quad (1)$$

Please note that this final eq 1 provides directly the concentration of the analyte without requiring the construction of a methodological calibration graph, as no isotopic effects are expected from the changes in the isotope composition of bromine.²¹

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of Individual BDE Congeners. In order to obtain individual labeled standards from the synthesis crude product, their chromatographic separation with UV detection was carried out. A reverse phase C18 column was used in this work, as it had been previously tested for the separation of brominated flame retardants showing good resolution in the separation of PBDE congeners present in commercial penta mixtures (congeners 28, 47, 99, 100, 153, and 154)^{16,22} which are the same compounds found in the synthetic mixture. The mobile phase consisted of methanol/water (92:8, v/v) at 1 mL min^{-1} in isocratic mode following a previously described procedure for the separation of these BDE congeners.¹⁶ Acetone turned out to be the most appropriate solvent for these PBDEs, allowing good resolution for the separation of the six congeners when injecting 20 μL of a natural abundance mixture (5 ppm of each congener) and with relatively short chromatographic run times. UV spectra were recorded over the range of 200–280 nm, showing an optimal absorption wavelength between 200 and 210 nm, which is in agreement with the values found in literature.^{22,23} Therefore, detection at 206 nm was selected in this work, as it allowed the detection of all the congeners of interest at the selected chromatographic separation conditions.

Once the separation conditions were optimized, individual natural standards of the six BDEs of interest were injected in the HPLC system in order to identify each congener in the mixture by their retention time. Then, the labeled standard mixture (in acetone) was injected into the same chromatographic system for the fraction collection. The initial and final collection time for each fraction were set daily by comparison of the retention times with a natural abundance standard mixture. Figure 1 shows

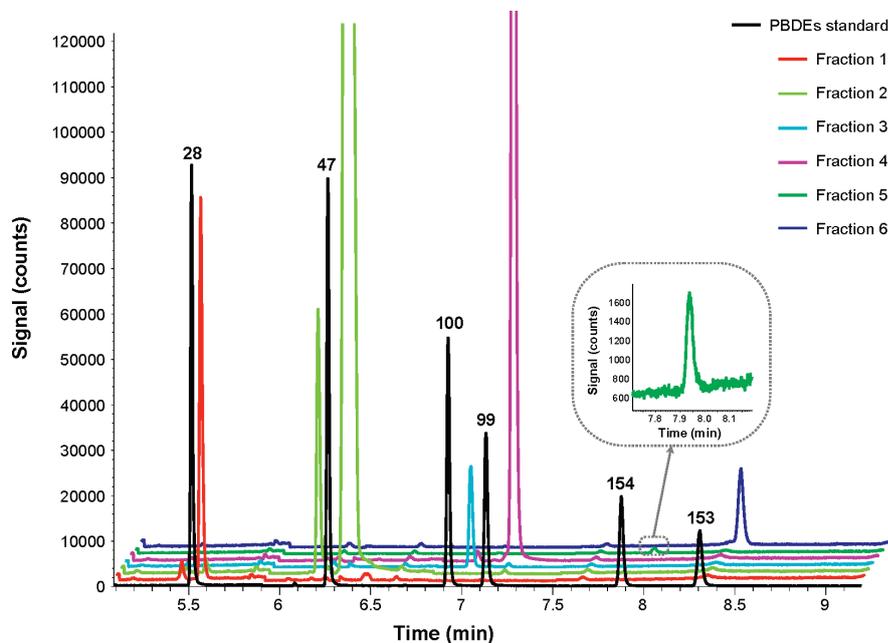


Figure 2. GC(EI)MS chromatogram for the six fractions collected and for a natural standard mixture of BDEs 28, 47, 99, 100, 153, and 154.

overlaid chromatograms for the natural abundance and labeled mixtures of PBDEs. Collected fractions from F1 to F6 are also indicated in Figure 1. As can be seen on the natural standard chromatogram, the optimized conditions seemed to allow a complete separation of each congener of interest. In the chromatogram obtained for the ^{81}Br -labeled mixture, there are some congeners that cannot be observed by UV absorption (100, 153, and 154). However, previous injections of the crude product in our GC(EI)MS system confirmed their presence in the synthetic mixture. Therefore, these fractions were collected and treated in the same way as the others even though their corresponding congeners were present at such a low concentration in the labeled mixture that could not be detected.

Each fraction was evaporated to dryness under nitrogen to remove the mobile phase and was redissolved in isoctane. Then, equivalent fractions obtained from successive injections were collected together and pre-concentrated under nitrogen to a final volume of ca. 1 mL. Finally, the six extracts were injected in the GC(EI)MS to check the purity of each fraction and get a preliminary estimate of their concentration. Figure 2 shows the chromatograms obtained for fractions F1 to F6 and for a natural standard mixture. As can be seen, each fraction contained only one congener except for F2 which showed another tetrabrominated congener that eluted earlier than BDE-47. This compound was identified by its retention time (in comparison with SRM 2257) and its mass spectrum and turned out to be BDE-49.

Preparation of the ^{81}Br -Labeled PBDEs Standard. After the separation of the different BDEs, a spike mixture was prepared taking into account the most common congener profiles found in environmental and biological samples. Environmental samples usually show congener patterns similar to the composition of the commercial penta-mix formula (Bromkal 70-SDE),²⁴ whereas in biological samples BDE 47 is usually the major congener,

representing sometimes up to 60–70% of the total BDEs content, followed in most cases by BDE 99 and BDE 100 or BDE 153.²⁵ Therefore, a BDEs mixture with a congener profile that would allow the simultaneous determination of all priority BDEs in both environmental and biological samples was prepared. As BDE 49 was present in fraction F2 together with BDE 47 and it has also been found in real samples, although at lower concentration levels, it was decided to include and certify this congener also in the final spike mixture.

Determination of the Isotope Composition of the ^{81}Br -Labeled Compounds. The isotopic composition of bromine in the original synthesized mixture had been previously determined by GC(ICP)MS for congeners 28, 47, and 99 showing isotopic abundances (atom %) of 99.53 for isotope 81 and 0.47 for isotope 79.¹⁷ Thus, these values were initially given to all congeners isolated since no changes in the isotopic composition were expected during the HPLC separation process. However, it was observed that, for some labeled congeners, e.g., BDE-153 and BDE-154, the experimental isotopic profiles of the cluster corresponding to the molecular ion (M^+) did not match the profiles calculated using the theoretical abundance of 99.53% for ^{81}Br .²⁶ This could be due to two main reasons. First, the isotopic composition of bromine could be different from the observed value for the main synthetic products (99.53% ^{81}Br) and, second, there could have been contamination with the congeners of natural abundance during the synthesis, chromatographic separation, or pre-concentration processes. The discrimination between isotope enrichment and natural contamination was carried out by studying the molecular cluster M^+ for each congener using a GC(EI)MS. This study cannot be performed when ICP or NCI sources are employed instead of EI.

In order to figure out which of these two reasons was responsible for the modified isotopic profiles observed in the

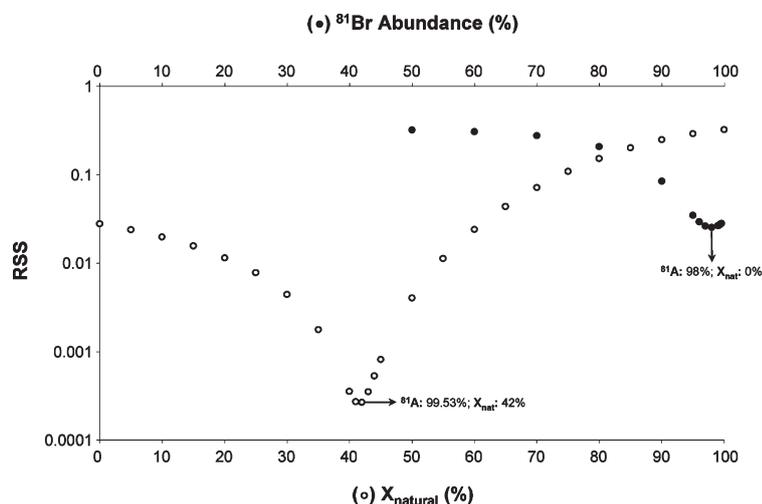


Figure 3. Residual sum of squares (RSS) for the multiple linear regression for BDE-153 calculated for different ^{81}Br enrichments (black points) and different impurity levels of the natural abundance congener in the ^{81}Br -labeled standard (white points).

hexabrominated BDEs 153 and 154, a multiple linear regression procedure was employed to fit the experimental isotope pattern to some theoretical isotope patterns. In this procedure, the experimentally observed isotope patterns of the molecular cluster M^+ for ten consecutive masses were compared to two sets of theoretically generated isotope patterns which took into account, in the first set, possible changes in the isotope enrichment of ^{81}Br (with no natural contamination) and, in the second set, the contamination from natural abundance BDEs (at the nominal enrichment of 99.53% ^{81}Br). Theoretical patterns for ten consecutive masses were generated²⁶ using a linear mixing model:

$$\begin{bmatrix} A_{\text{theo}}^1 \\ A_{\text{theo}}^2 \\ \dots \\ A_{\text{theo}}^9 \\ A_{\text{theo}}^{10} \end{bmatrix} = X_{\text{lab}}^{\text{sp}} \begin{bmatrix} A_{\text{lab}}^1 \\ A_{\text{lab}}^2 \\ \dots \\ A_{\text{lab}}^9 \\ A_{\text{lab}}^{10} \end{bmatrix} + X_{\text{nat}}^{\text{sp}} \begin{bmatrix} A_{\text{nat}}^1 \\ A_{\text{nat}}^2 \\ \dots \\ A_{\text{nat}}^9 \\ A_{\text{nat}}^{10} \end{bmatrix}$$

Where a given molar fraction of the labeled compound ($X_{\text{lab}}^{\text{sp}}$) at a given isotope enrichment of bromine 81, A_{lab}^i was mixed with a given molar fraction of natural abundance compound ($X_{\text{nat}}^{\text{sp}}$) of isotope composition A_{nat}^i . The theoretical abundances for the different A_{theo}^i were computed then for different molar fractions of natural and labeled compound.

Finally, the theoretical abundances were subtracted from the experimental abundances, and the residual sum of squares (RSS) were calculated for different combinations of isotope enrichment and natural contamination. Figure 3 shows the results obtained for BDE-153. If we assumed the natural contamination negligible, the best isotope enrichment of ^{81}Br resulted to be 98% (black dots). However, a much better fit was obtained when the isotope composition of bromine was assumed to be the nominal isotope enrichment of 99.53%, and we considered a contribution of 41.7% of natural abundance BDE-153 in the spike (white dots). The comparison between the theoretical abundances calculated for both situations and the experimental abundances measured are shown in the Supporting Information (Figure S1).

The same procedure was applied to the other six congeners. In all cases, the best fit resulted in an isotope enrichment of 99.53% for ^{81}Br with natural contamination for some congeners. Fortunately, only BDE-154 showed a noticeable contribution from natural contamination with a 24.4% of natural abundance compound in the isolated fraction. For comparison, Figure S2 where the minimum found at the isotope composition of 99.53% is clearly observed with no significant natural contribution. Until now, the source of the natural contamination for the hexabrominated BDEs 153 and 154 could not be found.

For isotope dilution analysis of congeners 153 and 154 in real samples, the natural contribution must be taken into account in the calculations because the addition of the spike carries also some natural abundance compound. We have modified the isotope dilution eq 1 to take into account the natural abundance contribution in the spike. Thus, for congeners 153 and 154, the equation used was

$$\frac{N_{\text{nat}}}{N_{\text{lab}}} = \frac{X_{\text{nat}}}{X_{\text{lab}}} \cdot X_{\text{lab}}^{\text{sp}} - X_{\text{nat}}^{\text{sp}} \quad (2)$$

In eq 2, the determined natural contribution to the spike, $X_{\text{nat}}^{\text{sp}}$ corresponding to 0.417 for BDE-153 and 0.244 for BDE-154, was used as a correction factor.

Characterization and Stability of the ^{81}Br -Labeled PBDEs Standard. The concentrations of the different BDE congeners in the labeled mixture were determined by reverse isotope dilution analysis using a certified reference material (SRM 2257) as natural abundance reference. For this purpose, an appropriate mixture between the reference material and the ^{81}Br -labeled PBDEs standard was injected in the GC(EI)MS system. In all cases, 10 consecutive masses were selected for the isotope pattern deconvolution calculations. The results obtained for five independent determinations are shown in Table 2. As can be observed, BDE-47 is the main component of the spike mixture. Please note that the concentrations given correspond to the total concentration including the natural contribution when applicable (congeners 153 and 154). Total combined uncertainties

were calculated using Kragten procedure, and the contribution of the different uncertainty sources are included in Table 2. In all cases, two uncertainty sources were dominant: the uncertainty in the concentration of the natural reference standard SRM 2257 and the uncertainty in the experimental measurement of the blend ratio (eqs 1 and 2). For BDEs 49, 153, and 154, the main uncertainty source was the analytical measurement while for BDEs 28, 47, 99, and 100 the main source was the uncertainty in the reference standard.

The spike stability was evaluated in two different forms. First, possible isotope exchange between bromine atoms from the natural abundance compounds and the spike was evaluated. An aliquot of the spike was mixed with a natural abundance standard containing congeners 28, 47, 99, 100, 153, and 154, and this mixture was measured on different days during a period of 4 months. The results obtained are shown in the Supporting Information Figure S3. No changes in the ratio of molar fractions $X_{\text{nat}}/X_{\text{lab}}$ were observed for any of the compounds measured during this period, indicating that no isotope exchange between bromine atoms from the natural abundance and labeled compounds took place. This is an important fact as it demonstrates the validity of this mode of labeling as alternative to the standard ^{13}C labeling.

Second, the spike stability was evaluated in terms of concentration as a function of time for a period of 4 months also. Concentrations of each labeled BDE congener were obtained on

different days by reverse isotope dilution analysis using mixtures between the natural and labeled standards which were prepared on the same day they were measured. The results obtained are also included in the Supporting Information Figure S4. The measured concentrations remained constant throughout the studied period. Thus, we can conclude that the spike is reasonably stable and does not suffer from isotope exchange when mixed with the natural abundance compound.

Determination of PBDEs in a Lake Michigan Fish Tissue SRM 1947. Once the ^{81}Br -labeled spike was demonstrated to be suitable for its use in isotope dilution analysis, the previously developed methodology, based on isotope pattern deconvolution,¹⁷ was applied to the determination of PBDEs in a Lake Michigan fish tissue reference material. The SRM 1947 samples were treated as described in the Procedures section. Two independent experiments and a blank were performed at three increasing spike levels (indicated as blend 1, blend 2, and blend 3). The different spike levels were selected in order to detect possible spectral interferences during the quantitation procedure. Also, the three spike levels were selected in order to study error propagation in isotope pattern deconvolution. In principle, all spike levels would provide molar fraction ratios ($X_{\text{nat}}/X_{\text{lab}}$) for all compounds in the range of 0.1–10 since better precision in the measurements are expected under these conditions.

Quantitation of PBDEs in SRM 1947 samples was carried out by the isotope pattern deconvolution procedure described previously,¹⁷ selecting here five masses for each compound (except BDE-28 where only four masses were employed). Three of these masses corresponded to the most abundant masses of natural abundance BDEs, and the other two masses corresponded to the most abundant masses in the labeled compound (for details, see Table S1 in the Supporting Information). The obtained results are shown in Table 3. As can be observed, the concentrations are in good agreement with the certified values, except for BDE-28 + 33, for the three studied spike levels. Recoveries were between 89% and 116% in all cases, which can be considered acceptable in ultratrace analysis. With regards to BDE-28, it is worth stressing that the indicative value is given for the mixture of BDEs 28 and 33 which cannot be resolved in our chromatograph. Furthermore, it was observed that, for spiked SRM 1947 samples, the experimental isotopic profile did not match the typical isotopic profile for mixtures between labeled and unlabeled tribrominated congeners, showing unexpected interferences at masses 407.8 and 410.8. This fact could be observed by checking the residuals of the multiple linear regression. The residuals at mass 410.8 were very large, so this

Table 2. Concentrations of the Labeled PBDEs in the Spike Mixture Using SRM 2257 as Reference^a

congener	concentration (ng g ⁻¹)	uncertainty sources (%)	
		concentration of natural reference standard	measurement of blend ratio
BDE-28	378 ± 15	90	4
BDE-47	1810 ± 75	75	19
BDE-49	31 ± 4	3	96
BDE-99	313 ± 8	56	28
BDE-100	169 ± 4	50	27
BDE-153	372 ± 16	13	81
BDE-154	28 ± 2	6	93

^aUncertainties expressed as total combined uncertainty from $n = 5$ independent measurements. The two main sources of uncertainty are indicated.

Table 3. Concentration of Priority PBDEs in SRM 1947 Determined by Isotope Dilution Mass Spectrometry^a

congener	concentration (ng g ⁻¹)			certified concentration (ng g ⁻¹)
	blend 1	blend 2	blend 3	
BDE-28 + 33	6.3 ± 4.1	6.7 ± 3.8	7.5 ± 3.8	2.26 ± 0.46 ^b
BDE-47	79.4 ± 7.4	74.2 ± 7.9	77.2 ± 7.2	73.3 ± 2.9
BDE-49	4.2 ± 1.1	4.0 ± 1.0	4.2 ± 1.0	4.01 ± 0.1
BDE-99	21.4 ± 1.6	20.1 ± 1.7	21.1 ± 1.4	19.2 ± 0.8
BDE-100	19.9 ± 1.3	18.4 ± 1.5	19.1 ± 1.3	17.1 ± 0.6
BDE-153	4.6 ± 0.7	3.9 ± 0.6	3.4 ± 0.8	3.83 ± 0.04
BDE-154	8.0 ± 1.9	7.2 ± 1.5	7.8 ± 1.6	6.88 ± 0.52

^aMean values correspond to two separate extractions measured $n = 5$ times each. Uncertainties correspond to expanded uncertainty ($k = 2$). ^bNot certified. Indicative value only.

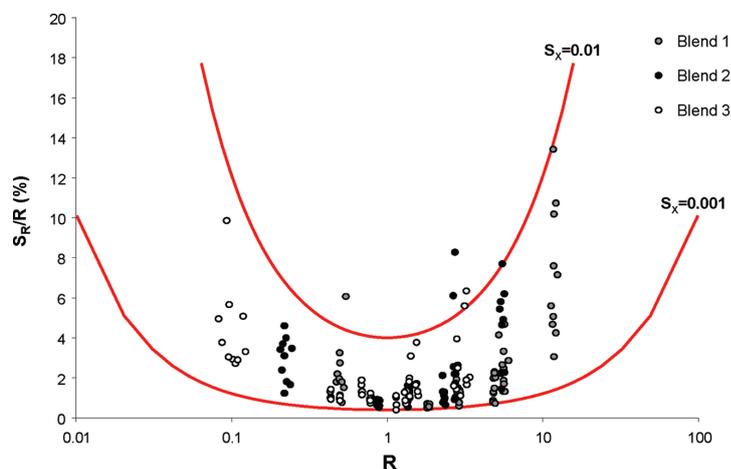


Figure 4. Error propagation studies in IDMS using molar fraction ratios.

mass was excluded from the calculations. Anyway, the final concentrations found for BDE-28 + 33 after excluding mass 410.8, given in Table 3, do not agree with the certified values, indicating the presence of spectral interferences for this congener also for other measured masses.

The experimental reproducibilities in the measured concentrations between samples spiked at the same level were calculated as RSD (%). The values obtained were always below 7% although, in most cases, reproducibilities below 3% were found. Detection limits were calculated from the variation in the three blank measurements performed during the analysis of the reference material. Detection limits between 0.02 and 0.9 ng·g⁻¹, expressed as three times the standard deviation of the measured blanks, were obtained.

Uncertainties and Error Propagation Studies. The concentrations of the natural abundance compounds in this mode of IDMS are calculated from the ratio of molar fractions, $R = X_{\text{nat}}/X_{\text{lab}}$, using eq 1 without requiring the construction of a methodological calibration graph, as no isotopic effects were expected.¹⁸ The molar fractions X_{nat} and X_{lab} are calculated from a multiple linear regression procedure which allows the estimation of the uncertainties in both parameters, $s_{X_{\text{nat}}}$ and $s_{X_{\text{lab}}}$, from the regression results for each injection. Also, X_{nat} and X_{lab} are correlated variables of constant sum ($X_{\text{nat}} + X_{\text{lab}} = 1$), so the correlation factor between these variables, $r = -1$, need to be taken into account for error propagation studies.²⁶ In summary, we have developed an equation for the calculation of the relative uncertainty in the ratio R from the measured uncertainties in X_{nat} and X_{lab} , taking into account the correlation between both variables. Equation 3 is the final equation obtained

$$\frac{s_R}{R} = \sqrt{\left(\frac{s_{X_{\text{nat}}}}{X_{\text{nat}}}\right)^2 + \left(\frac{s_{X_{\text{lab}}}}{X_{\text{lab}}}\right)^2 + 2\frac{s_{X_{\text{nat}}}s_{X_{\text{lab}}}}{X_{\text{nat}}X_{\text{lab}}}} \quad (3)$$

For the three blends prepared in the determination of PBDEs in SRM 1947, we performed a duplicate sample preparation and each sample was injected 5 times in the GC(EI)MS system. For each single injection, we can calculate the relative uncertainty in the ratio of molar fractions and plot this relative uncertainty as a function of the measured ratio, as it is usual in IDMS

calculations for the optimization of the spike addition.¹⁹ The results obtained for the three blends and the different congeners measured are shown in Figure 4. For each congener and blend, we have ten data points in the graph. Almost all values of R lie between 0.1 and 10. As can be observed in the graph, values of R close to $R = 1$ provide minimum error propagation values.

Figure 4 also contains two theoretical error propagation curves (red lines) calculated from eq 3 and assuming two extreme values for the uncertainties in the X_{nat} and X_{lab} molar fractions. In the best case, $s_x = 0.001$, relative errors in R will be lower than 2% for R values between 0.1 and 10. In the worst case, $s_x = 0.01$, the relative error in R will be lower than 12% for the same range of R values. Please note that, in both cases, an optimum is found for $R = 1$. The experimentally obtained s_x values were in all cases between these two extreme values (typically the average s_x was 0.003), and so, almost all data points are in between the two red curves.

Therefore, in view of the obtained results, any of the three studied spike levels can be considered acceptable for the determination of PBDEs in the certified reference material. However, blend 2 provided overall the lowest propagated uncertainties (Figure 4).

Expanded Uncertainties. For the calculation of expanded uncertainties in the measured blends, all uncertainty sources need to be taken into account including the experimental measurement uncertainty (Figure 4) and the uncertainties of other parameters such as the concentration of the spike, the deviation between duplicate samples, and the uncertainties in the sample weights taken. We have included the expanded uncertainties ($k = 2$) in Table 3. As can be observed, very similar expanded uncertainties are obtained for the different blends prepared indicating that, within the given limits of R , the overall experimental uncertainty is similar for all blends. It is remarkable the high relative uncertainties calculated for BDE-28 + 33 which can be ascribed mainly to high uncertainty in the blend ratio R caused by spectral interferences. In most cases, the larger contribution to the expanded uncertainty is in the uncertainty in the concentration of the spike (see table 2) and not so much the experimental measurement of the blend ratio R (Figure 4).

For example, for BDE-47, the contribution of the uncertainty in the concentration of the spike is ca. 80% of the total uncertainty. Values between 60% and 80% were obtained for the contribution of the uncertainty in the spike concentration for the other PBDE congeners.

Use of a Calibration Curve. For a comparison purpose, PBDEs were also determined in the certified reference material by means of a methodological calibration graph prepared from SRM 2257. Two independent samples and a blank were treated following the same sample preparation procedure, but in this case, $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-47 was added as internal standard for all studied congeners. Quantitation was carried out by monitoring the most abundant mass for each congener as well as for the internal standard. The concentrations obtained are summarized in the Supporting Information Table S2. Except for BDE-28 + 33, the recoveries ranged from 89% (BDE-47) to 151% (BDE-153), depending on the compound with relatively large expanded uncertainties. For BDE-47, the recovery using the same compound as ^{13}C -labeled internal standard was 89% which can be considered satisfactory at this concentration level. For the hexabrominated congeners BDE-153 and BDE-154, the recoveries obtained were not satisfactory. This could be due to the fact that $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-47 is not the best internal standard for these compounds as indicated in EPA method 1614.

In summary, the overall recoveries obtained using IDMS with the ^{81}Br -labeled compounds are a bit better than those obtained using the classical calibration graph with internal standard. However, the expanded uncertainties are sometimes better when the calibration graph (e.g., for BDE-47) is used, as the uncertainties in the concentrations of the labeled standards do not need to be taken into account.

CONCLUSIONS

We have demonstrated that the ^{81}Br -labeled PBDEs standard prepared in our laboratory can be extremely useful for the routine determination of priority PBDEs by GC(EI)MS in solid environmental samples. The labeled standard proved to be stable without noticeable isotopic exchange between bromine atoms. The suitability of the ^{81}Br -labeled standard for its use in IDMS experiments (particularly the lack of isotope exchange reactions) was demonstrated using a GC(EI)MS. The proposed IDMS method was validated by the analysis of SRM 1947 with good accuracy (recoveries between 89% and 116% except for BDE-28) and reproducibility (below 7%). The method does not require the construction of a methodological calibration graph, as no isotopic effects were detected and each injection can provide a concentration result with an uncertainty value associated. This alternative labeled standard could also be useful in the analysis of these compounds by IDMS using other more sensitive ion sources such as the negative chemical ionization source which cannot be used for the determination of these six priority pollutants using ^{13}C -labeled standards. The increased propagated uncertainty observed due to the uncertainty in the concentration of the spike could be minimized using a natural abundance certified standard with lower concentration uncertainties. Anyway, the procedure could be useful for fast and accurate routine analysis of PBDEs in environmental samples as the construction of a calibration graph is not required. We expect that these labeled standards will be commercially available in the near future.

ASSOCIATED CONTENT

S Supporting Information. Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: jiga@uniovi.es.

ACKNOWLEDGMENT

The work described in this paper was supported by the Ministry of Science and Innovation, Madrid, Spain (projects ref CTQ2006-05722 and CTQ2009-12814). A.G.-G. acknowledges her doctoral grant from the FPU program of the Spanish Ministry of Science and Innovation. We would like to thank Dr. M. Estela del Castillo Busto for her help with the HPLC separation procedure.

REFERENCES

- (1) WHO/IPCS. Environmental health criteria 192. *Flame retardants: a general introduction*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1997.
- (2) Rahman, F.; Langford, K. H.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N. *Sci. Total Environ.* **2001**, *275*, 1–17.
- (3) WHO/IPCS. Environmental health criteria 162. *Brominated diphenyl ethers*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 1994.
- (4) de Wit, C. A. *Chemosphere* **2002**, *46*, 583–624.
- (5) *Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) Project Plan*; U. S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, March 2006.
- (6) Hale, R. C.; La Guardia, M. J.; Harvey, E.; Gaylor, M. O.; Mainor, T. M. *Chemosphere* **2006**, *64*, 181–186.
- (7) Domingo, J. L. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1054*, 321–326.
- (8) Darnerud, P. O.; Eriksen, G. S.; Jóhannesson, T.; Larsen, P. B.; Viluksela, M. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109* (1), 49–68.
- (9) Losada, S.; Roach, A.; Roosens, L.; Santos, F. J.; Galceran, M. T.; Vetter, W.; Neels, H.; Covaci, A. *Environ. Int.* **2009**, *35*, 1142–1149.
- (10) Covaci, A.; Voorspoels, S.; Ramos, L.; Neels, H.; Blust, R. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1153*, 145–171.
- (11) Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, Amending and Subsequently Repealing Council Directives 82/176 EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and Amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council; *Official Journal of the European Communities*; European Parliament: Strasbourg, France, December 24, 2008; Vol. 348, pp 84–97.
- (12) Covaci, A.; Voorspoels, S.; de Boer, J. *Environ. Int.* **2003**, *29*, 735–756.
- (13) Wilbur, S.; Soffey, E. *The application notebook (Agilent Technologies)* **2004**, 28.
- (14) Eljarrat, E.; Lacorte, S.; Barceló, D. *J. Mass Spectrom.* **2002**, *37*, 76–84.
- (15) Swarthout, R. F., Jr.; Kucklick, J. R.; Davis, W. C. *J. Anal. Spectrom.* **2008**, *23*, 1575–1580.
- (16) Lagalante, A. F.; Oswald, T. D. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2249–2256.
- (17) González-Gago, A.; Marchante-Gayón, J. M.; Ferrero, M.; García Alonso, J. I. *Anal. Chem.* **2010**, *82* (7), 2879–2887.
- (18) González Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G.; García Alonso, J. I. *Analyst* **2010**, *135* (5), 953–964.
- (19) Heumann, K. G. In Adams, F., Gijbels, R., Van Grieken, R., Eds.; *Inorganic Mass Spectrometry*; Wiley: New York, 1988; pp 301–376.

- (20) De Boer, J.; Allchin, C.; Law, R.; Zegers, B.; Boon, J. P. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2001**, *20*, 591–599.
- (21) Roth, E. *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 1753–1828.
- (22) Riess, M.; van Eldik, R. J. *Chromatogr., A* **1998**, *827*, 65–71.
- (23) Pöhlein, M.; Segura Llopis, A.; Wolf, M.; van Eldik, R. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1066*, 111–117.
- (24) Sjödin, A.; Jakobsson, E.; Kierkegaard, A.; Marsh, G.; Sellström, U. *J. Chromatogr., A* **1998**, *822*, 83–89.
- (25) Law, R. J.; Allchin, C. R.; de Boer, J.; Covaci, A.; Herzke, D.; Lepom, P.; Morris, S.; Tronczynski, J.; de Wit, C. A. *Chemosphere* **2006**, *64*, 187–208.
- (26) García Alonso, J. I.; Rodríguez-González, P.; González-Gago, A.; González-Antuña, A. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *664*, 68–76.

Supplementary information

Figure S1. Comparison between the theoretical and experimental isotope composition for ^{81}Br -labeled BDE-153 at the molecular cluster. The best fit corresponded to a nominal abundance of 99.53% ^{81}Br but with a ca. 42% molar fraction of natural abundance BDE-153.

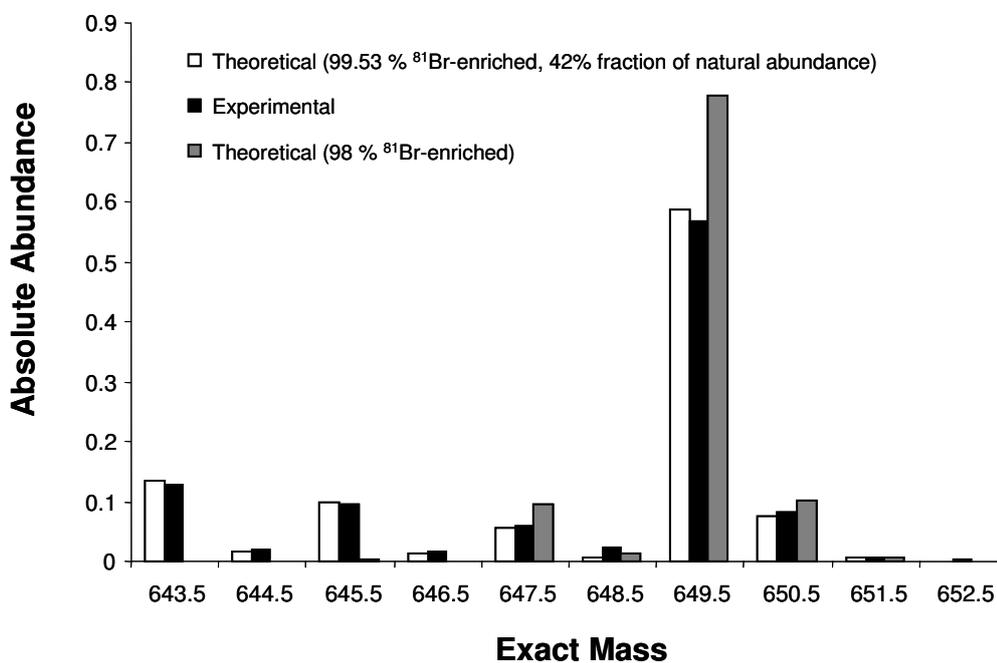


Figure S2. Plot of the residual sum of squares (RSS) for BDE-47 when changing the isotope abundance for ^{81}Br in the theoretical calculations. The best fit corresponded to a 99.53% ^{81}Br abundance with negligible natural BDE-47 contribution.

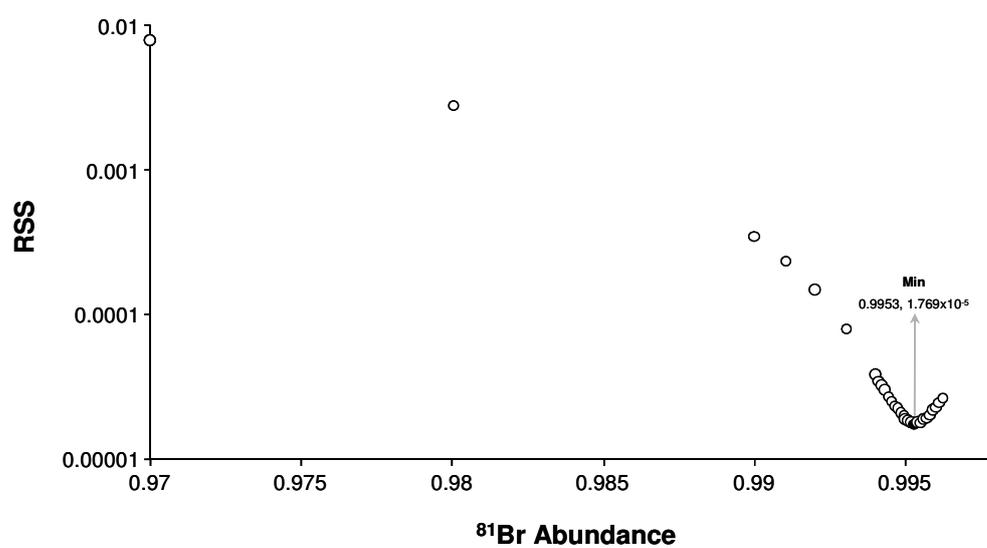


Figure S3. Evaluation of isotope exchange between a natural abundance bromine PBDEs standard and the ^{81}Br -enriched bromine PBDEs spike in one blend between a natural mixed standard and the isotopically labelled analogue for PBDEs 28, 47, 99, 100, 153 and 154 measured during 4 months. The ratio of molar fractions between natural and labelled PBDEs remained constant during the studied period and with low regression residuals. This indicates no isotope exchange between bromine atoms.

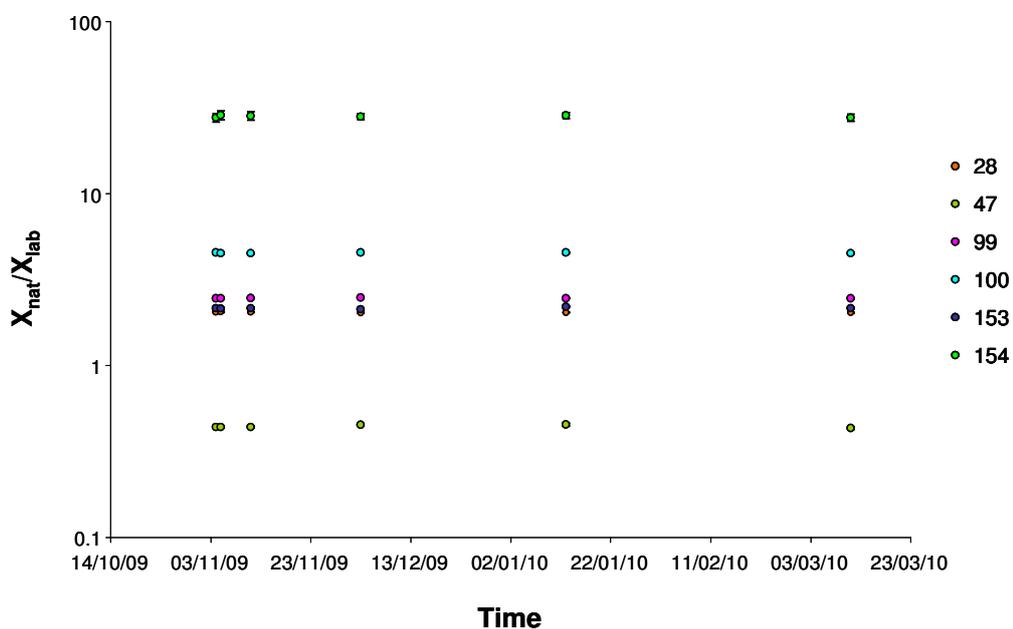


Figure S4. Stability of the isotopically labelled PBDEs mixture measured during a period of 4 months. A separate blend between the natural abundance standard and the mixed spike was prepared for each measurement in quintuplicate. During this period the spike solution was kept refrigerated at 4 °C.

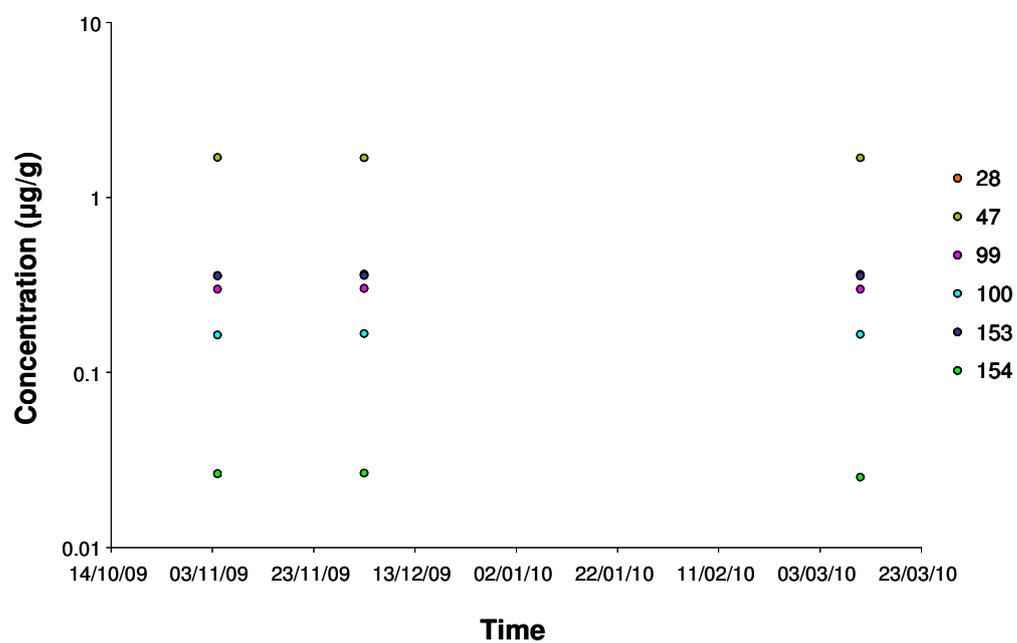


Table S1. Selected masses for the determination of priority PBDEs (plus BDE-49) in SRM 1947 by isotope dilution analysis

Congener	Number of Br atoms	m/z selected for IDMS
BDE-28	3	403.8, 405.8, 407.8, 409.8*
BDE-47	4	483.7, 485.7, 487.7, 489.7, 490.7
BDE-49	4	483.7, 485.7, 487.7, 489.7, 490.7
BDE-99	5	563.7, 565.7, 567.7, 569.7, 570.7
BDE-100	5	563.7, 565.7, 567.7, 569.7, 570.7
BDE-153	6	643.5, 645.5, 647.5, 649.5, 650.5
BDE-154	6	643.5, 645.5, 647.5, 649.5, 650.5

*Mass 410.8 in BDE-28 could not be used due to strong spectral interferences.

Table S2. Concentration of PBDEs in SRM 1947 obtained by external calibration using $^{13}\text{C}_{12}$ BDE-47 as internal standard.

Congener	m/z used	Concentration found (ng g ⁻¹)**	Certified concentration (ng g ⁻¹)
BDE-28+33	405.8	1.50 ± 0.24	2.26 ± 0.46*
BDE-47	485.7	65.4 ± 5.5	73.3 ± 2.9
BDE-49	485.7	5.14 ± 0.42	4.01 ± 0.1
BDE-99	563.6	20.5 ± 1.2	19.2 ± 0.8
BDE-100	563.6	17.5 ± 1.1	17.1 ± 0.6
BDE-153	643.5	5.8 ± 1.4	3.83 ± 0.04
BDE-154	643.5	9.1 ± 1.5	6.88 ± 0.52

* Not certified. Indicative value only.

**Uncertainties expressed as expanded uncertainties with 95% confidence (k=2)

D.3.3.2 Artículo científico IV: *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 401, 2639-2649

Anal Bioanal Chem
DOI 10.1007/s00216-011-5323-6

ORIGINAL PAPER

Determination of ultra-trace levels of priority PBDEs in water samples by isotope dilution GC(ECNI)MS using ^{81}Br -labelled standards

Adriana González-Gago · Sicco H. Brandsma · Pim E. G. Leonards · Jacob de Boer · Juan Manuel Marchante-Gayón · J. Ignacio Garcia Alonso

Received: 25 May 2011 / Revised: 29 July 2011 / Accepted: 6 August 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract A gas chromatography electron capture negative ionization mass spectrometry (GC(ECNI)MS) procedure for the determination of priority polybrominated diphenyl ethers (PBDEs; congeners 28, 47, 99, 100, 153 and 154) in water samples at regulatory EU levels has been developed. The method is based on the use of ^{81}Br -labelled PBDEs for isotope dilution analysis and the measurement of $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ isotope ratios in gas chromatography peaks with the electron capture negative ionization technique. The suitability of this ion source for the precise and accurate measurement of bromine isotope ratios has been demonstrated. The general ECNI-IDMS procedure was evaluated by the analysis of NIST SRM 1947 (Lake Michigan fish tissue) with satisfactory results. For the analysis of water samples, 500 mL of the samples were spiked with the labelled PBDEs and extracted with 10 mL iso-octane for 30 min. The extract was evaporated down to ca. 100 μL and injected in the GC(ECNI)MS. Detection limits ranged from 0.014 $^{-1}$ to 0.089 pg mL^{-1} depending on the congener. Recoveries from real water samples, spiked at a level of 0.5 pg mL^{-1} , ranged from 77% to 102%.

Keywords Isotope dilution mass spectrometry · Polybrominated diphenyl ethers · ^{81}Br -labelled standards · Electron capture negative ionization

A. González-Gago · J. M. Marchante-Gayón · J. I. Garcia Alonso (✉)
Department of Physical and Analytical Chemistry,
Faculty of Chemistry, University of Oviedo,
33006 Oviedo, Spain
e-mail: jiga@uniovi.es

S. H. Brandsma · P. E. G. Leonards · J. de Boer
Institute for Environmental Studies, VU University,
De Boelelaan 1087,
1081 HV Amsterdam, The Netherlands

Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a family of 209 chemical substances (congeners) which are added as flame retardants to a wide range of polymeric materials [1, 2]. These compounds are not chemically bound to the polymers so they can be easily released into the environment [3]. Consequently, PBDEs have been distributed worldwide and are nowadays being found in nearly all environmental compartments [3, 4]. Special attention has been paid by environmental scientists to the constituents of the pentaBDE technical product [5], as these compounds are volatile enough to permit their long-range transport [6]. Furthermore, it has been found that congeners with less than seven bromine atoms are more bioaccumulative than heavier PBDEs [7], exhibiting large biomagnification factors through the food chain [8]. As a result, the congeners present in the pentaBDE technical product, have been detected at increasing levels not only in environmental samples (sediments, sludge, house dust and indoor and outdoor air) but also in biological samples (human adipose tissues, serum, breast milk, fish, birds and marine mammals) and foodstuffs [2, 9]. Besides, observed adverse effects are generally more pronounced for congeners constituting the pentaBDE technical product, which seem to cause toxic effects at lower doses than the higher brominated BDEs [10]. Consequently, the production and use of pentaBDE mixtures has been banned in Europe and in several states in the USA since 2004 [11]. The European Union has issued a Directive [12] in which congeners number 28, 47, 99, 100, 153 and 154 will need to be measured in European freshwaters at levels below 0.5 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$. The US EPA has included congeners 47, 99 and 100 in the unregulated contaminants list to be measured in freshwaters and congeners 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183

and 209 have also been proposed to be included in a European monitoring programme for feed and food [13].

Due to these analytical challenges, new methods for the determination of these compounds have been developed but these still need further improvement in terms of sensitivity, precision and accuracy [14]. These methodologies require a sample preparation stage which usually involves several steps such as drying of solid samples followed by extraction of the analyte from the sample matrix with organic solvents and finally clean up and fractionation of the organic extracts [14, 15]. The techniques most widely used for the determination of PBDEs are gas chromatography (GC) coupled to electron capture or mass spectrometry (MS) detectors [9]. Low resolution (LR) mass spectrometers are more frequently used in routine analysis since high resolution (HR) instruments are more expensive and require experienced users. HR-MS is almost exclusively operated in electron impact (EI) mode, but LR-MS has been widely employed working either in electron capture negative ionization (ECNI) or in EI modes [14].

Several analytical methodologies have been developed for the determination of PBDEs in biological and environmental samples, although procedures based in isotope dilution mass spectrometry (IDMS) are usually preferred since they provide better results in terms of precision and accuracy [16]. However, to date, only ^{13}C -labelled standards are commercially available, so IDMS is only suitable when using ion sources which generate carbon-containing ions as both compounds coelute in the gas chromatograph [17]. Therefore, the EI source in positive mode has been often selected for the determination of PBDEs by IDMS using both HR [16, 18] and LR [19] analysers. Unfortunately, under standard conditions, the ECNI source provides negative ion mass spectra dominated by non specific bromide ions, so most PBDEs (except BDE-209) cannot be quantified by ECNI in combination with IDMS using the commercially available ^{13}C -labelled standards [20, 21]. However, by modifying the source conditions Ackerman et al. [17] could detect carbon-containing negative ions suitable for ^{13}C IDMS for high-level samples. On the other hand, the ECNI source is often selected for ultra-trace analysis of PBDEs as it provides lower detection limits than the EI source using the same mass analyzers.

We have prepared and characterised a series of ^{81}Br -labelled PBDE standards which would allow the combination of the high sensitivity ECNI source with the accuracy and precision provided by IDMS. The synthesis of the ^{81}Br -labelled analogues has been reported [22] and their purification and characterisation in both concentration and isotopic abundances has been given [23]. Using GC(EI)MS, it was observed that no isotopic exchange took place between bromine ions from the analyte and the labelled

standards demonstrating the suitability of these compounds for IDMS [23].

In this work, the ^{81}Br -labelled standards have been applied for the determination of the six European priority BDEs (28, 47, 99, 100, 153 and 154) in river waters at $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ levels. The determination of priority PBDEs was carried out by IDMS using a quadrupole MS fitted with an ECNI source as GC detector. First, the capabilities of the GC(ECNI)MS system for elemental bromine isotope ratio measurements were evaluated in two different instruments. Then, the proposed methodology was evaluated by analyzing a certified reference material SRM 1947 (Lake Michigan fish tissue) and applied for the analysis of river waters at regulatory EU levels.

Experimental

Reagents and materials

Individual standards of 6 PBDE congeners (28, 47, 99, 100, 153 and 154, $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in nonane) were obtained from Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, USA). SRM 1947 (Lake Michigan fish tissue) and SRM 2257 (PBDE Congeners in 2,2,4-trimethylpentane) were both obtained from the National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg, USA.

All solvents used in this work were of the highest purity. Acetone and hexane were obtained from Fluka (Steinheim, Germany) and dichloromethane and diethyl ether from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Ultra-pure water was obtained from a Milli-Q Gradient A10 water purification system (Millipore S.A.S, Molsheim, France). Working standard solutions of labelled and unlabelled PBDEs were prepared by weight in methanol or isooctane, both from Sigma-Aldrich, and stored in the dark at $4\ ^\circ\text{C}$ until use.

Sampling bottles (500 mL, amber glass) and all glassware used for sample preparation were cleaned with detergent (Mucosol from Brand GmbH, Wertheim, Germany), rinsed with Milli-Q water, dried in an oven, brought to room temperature and stored. Just before use, all glassware was rinsed twice with hexane and acetone and allowed to dry at room temperature. Anhydrous sodium sulphate (Merck, Darmstadt, Germany) was used to dry the SRM 1947 samples and silica gel (0.063–0.200 mm) for column chromatography (Merck) was used in the clean up and fractionation steps for the SRM 1947 sample preparation.

Instrumentation

Two GC(ECNI)MS instruments were compared for bromine isotope ratio measurements in PBDEs. The GC model 6890N (Agilent Technologies, Wöhlbronn, Germany) was

Ultra-trace levels of priority PBDEs in water samples

located at the VU University in Amsterdam, The Netherlands and was equipped with a split/splitless injector and a MSD model 5975B (Agilent Technologies, Tokyo, Japan). Injections (1 μL) were carried out automatically by an autosampler model 7683 (Agilent). The chromatographic separation was carried out using a low-polarity capillary column SGE BPX5 (SGE Analytical Science, Bester, Amstelveen, The Netherlands; 50 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness).

The second instrument was a GC(ECNI)MS model QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) and was installed at the University of Oviedo, Spain. This instrument was fitted with a split/splitless injector. Sample, spikes and standard solutions (2 μL) were injected in each case automatically by an autosampler model AOC-5000 (Shimadzu). The chromatographic separation was carried out using a low-polarity capillary column DB-5MS Ultra Inert (J&W Scientific, Folsom, CA, USA; 30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness), as it has been one of the most used and tested for PBDEs [14]. All analytical determinations in SRM 1947 and river water samples were performed in this second instrument. Operating conditions are summarized in Table 1.

All standard solutions and mixtures were prepared gravimetrically using an analytical balance model AB204-S (Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Switzerland). A mechanical shaker (Heidolph REAX 2, Kelheim, Germany) was used for the liquid-liquid extraction of PBDEs from water samples.

Table 1 GC(ECNI)MS operating conditions for the Shimadzu instrument

GC and interface parameters	
Column	DB-5MS UI (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm)
Injection mode	Pulsed splitless
Splitless time	2 min
Pulse	200 kPa, 1.5 min
Injection volume	2 μL
Carrier gas / Flow	He / 2 mL \cdot min $^{-1}$
Injection temperature	300 $^{\circ}\text{C}$
Oven programme	120 $^{\circ}\text{C}$ to 300 $^{\circ}\text{C}$ (10 min) at 30 $^{\circ}\text{C}\cdot$ min $^{-1}$
Interface temperature	280 $^{\circ}\text{C}$
ECNI ion source and MS parameters	
Source temperature	230 $^{\circ}\text{C}$
Source voltage	70 V
Emission current	150 μA
Reagent gas	CH ₄
Acquisition mode	SIM
Selected <i>m/z</i>	79 and 81
Dwell time	50 ms
Solvent delay	3.5 min

Procedures

Determination of PBDEs in SRM 1947

Samples of Lake Michigan fish tissue (SRM 1947) were prepared following a previously described sample preparation procedure [24] with some modifications. In brief, homogenized fish tissue was ground in a mortar with anhydrous sodium sulphate and allowed to dry for 3 h. Then, the samples (ca. 1 g) were spiked with the ⁸¹Br-BDEs standard mixture at three spike levels (blends 1, 2 and 3). For blend 2 the spiked concentrations were 16.7 (BDE 28), 1.40 (BDE 49), 81.2 (BDE 47), 14.2 (BDE 99), 7.68 (BDE 100), 15.8 (BDE 153) and 1.09 (BDE 154) ng \cdot g $^{-1}$. For blend 1, the spike concentrations were half and for blend 3 double of those indicated for blend 2. Spiked samples were Soxhlet extracted for 12 h with hexane/acetone (3:1, v/v). The extract was concentrated, cleaned up on acidic silica gel columns (40% H₂SO₄) and eluted with dichloromethane/hexane (3:7, v/v). The collected fraction was concentrated under nitrogen and eluted over a fractionation silica gel column (2% H₂O) with hexane, hexane/diethyl ether (85:15, v/v) and diethyl ether. The two first fractions, containing the PBDEs, were mixed and then evaporated under nitrogen down to a few microlitres and stored in the dark at 4 $^{\circ}\text{C}$ until analysis. Finally, 2 μL of the organic extract were injected in the GC(ECNI)MS system. Concentrations were calculated for each congener by the elemental isotope dilution equation [25].

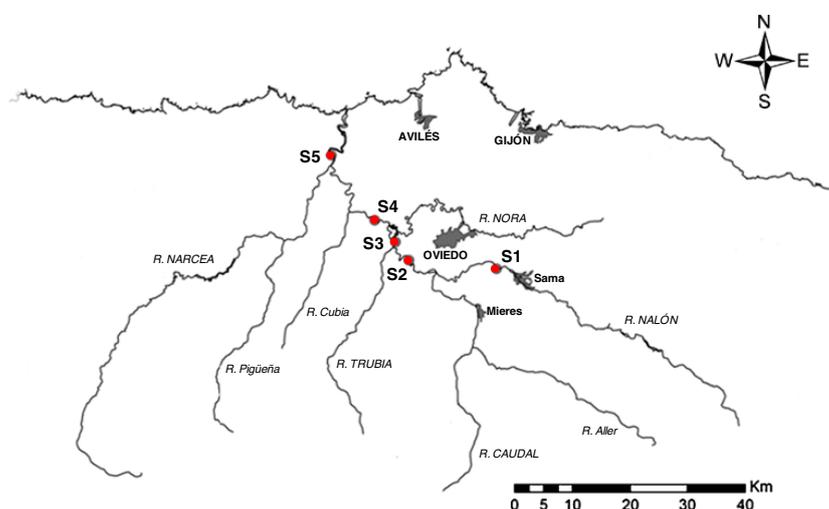
River water collection

The study area is located in the northwest of Spain along the River Nalón. Water samples (500 mL) were collected in pre-weighed graduated amber glass bottles fitted with PTFE coated PBT screw caps during July 2010 at the five sampling sites shown in Fig. 1 and in duplicate. The first sampling site was the closest to the river source and it was selected before the confluence of River Nalón with any of its main tributaries. The other four sampling sites were located downstream just beyond its confluence with each of its main four tributaries (rivers Caudal, Trubia, Nora and Narcea). No filtration of the samples was performed according to EU regulations as, for organic compounds, the suspended particulate phase should be included in the analyses [12].

Determination of PBDEs in river water samples

Sample preparation was performed in the same glass bottles used for sampling. All samples collected were weighed in the lab and one of the two samples collected at the same sampling site were spiked (by weight) with a mixture of

Fig. 1 Sampling locations in the River Nalón



natural abundance certified PBDEs in methanol at 0.5 pg g^{-1} for recovery studies. Then, a known amount of the ^{81}Br -labelled standard in methanol was added to all samples to get a final spike concentration of 1.36 (BDE 28), 6.53 (BDE 47), 1.14 (BDE 99), 0.62 (BDE 100), 1.19 (BDE 153) and $0.08 \text{ (BDE 154) pg g}^{-1}$ respectively. Finally, approximately 10 mL of isooctane were transferred to each river water bottle. The samples were mechanically shaken for 30 min and then the organic extracts separated and centrifuged to break up the formed emulsions. Next, the organic extracts were removed and pre-concentrated under nitrogen to a final volume of ca. 100 μL and stored in the dark at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ until analysis. Finally, 2 μL of each organic extract were injected in the GC(ECNI)MS system, the isotope ratios $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ measured as peak area ratios and the concentrations calculated for each priority congener by the elemental isotope dilution equation [25].

Results and discussion

Evaluation of the ECNI source for bromine isotope ratio measurements

The ECNI source has been widely used for the determination of PBDEs in different samples, especially when very low concentrations need to be determined, since it provides, in general, lower detection limits than the EI source when working at LR [14]. One of the characteristics of the ECNI source in the analysis of PBDEs is that, under standard conditions, it produces almost exclusively bromide ions ($^{79}\text{Br}^-$ and $^{81}\text{Br}^-$) showing barely molecular ions and/or fragments containing C atoms. So, our ^{81}Br -labelled standard would allow the determination of PBDEs in

different samples by IDMS using an ECNI source. In principle, concentrations could be obtained using the elemental isotope dilution equation in a way similar to other determinations carried out by GC(ICP)MS [26–28].

To our knowledge, the ECNI source has not been employed previously in IDMS experiments in combination with ^{81}Br or any other heteroatom labelling. So, the GC (ECNI)MS system needs to be evaluated for elemental isotope ratio measurements in terms of precision and accuracy. Mass bias, spectral interferences and detector linearity are traditional factors influencing the accuracy of isotope ratio measurements in elemental ion sources such as the ICP [25]. On the other hand, isotope ratio precision is usually limited by counting statistics and ion source fluctuations. However, none of those factors have previously been described for instruments containing the ECNI source. In this paper, two instruments from two different manufacturers are evaluated.

Spectral interferences (the presence of contributions other than the analyte at the m/z of interest) can affect the accuracy in isotope ratio measurements. In fact, elemental IDMS can only be carried out if two isotopes of the element to be determined are free of spectral interferences [25]. The ECNI source in combination with MS is a very selective technique towards aromatic brominated compounds as only electrophilic molecules can be ionized. This fact makes the ECNI source very suitable for the determination of brominated aromatic compounds by IDMS as spectral interferences are seldom expected [29]. Mass bias, the differential transport of ions through the mass spectrometer, is another parameter that can affect the accuracy in isotope ratio measurements in transient signals. To date, this parameter has never been evaluated for the ECNI source as quantitation has always been carried out by means of a

calibration graph. However, mass discrimination effects must be taken into account for quantitation by elemental IDMS. Finally, the linearity of the detector can affect the accuracy of the IDMS results for isotope ratios far from 1 as one ion can be out of the linearity range while the other ion still within this range.

In order to evaluate all these parameters in a single experiment, standard mixtures of natural abundance PBDEs (from tri- to hexa-brominated congeners) at different concentration levels were injected in the two commercial instruments (single injections). The fact that both instruments employed different analytical columns was not considered relevant as the chromatographic conditions will not influence the measurement of bromine isotope ratios. The isotope ratio results from both instruments (measured as $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ peak area ratios) were plotted versus the measured ^{79}Br peak area. The results obtained for all congeners in both instruments are shown in Fig. 2. First, no influence of the nature of the congener on the measured isotope ratio was evident, so this information is not included in Fig. 2. Second, calibration graphs obtained by plotting the measured peak areas versus the concentration of each congener were linear both at m/z 79 and 81 for the studied concentration ranges (from ca. $0.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ to $2,000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ in both instruments, data not shown), why problems with a non-linear detector response are not expected.

As can be seen in Fig. 2 at high concentrations, where isotope ratios are more precise, the measured isotope ratios were slightly biased towards the heavier isotope in the Agilent instrument whereas the Shimadzu instrument showed a somewhat larger bias towards the lighter isotope. The different mass discrimination effects observed for each

instrument can be due to the specific system configuration and might occur during the extraction, mass analysis and detection of the negative ions [30]. No experiments were performed to study the influence of the ion lens settings on mass bias as both instruments were only optimised for maximum signal. Therefore, in further IDMS determinations, the mass bias factor (ratio of measured to theoretical isotope ratio) must be measured using a natural isotope abundance PBDE standard as optimum instrumental settings can change on a daily basis in the GC(ECNI)MS system. The measured isotope ratios do not seem to vary with the measured peak areas at mass 79 at increasing concentrations for both instruments (Fig. 2), which means that detector non-linearity effects (e.g. detector dead time) are negligible for this concentration range.

The statistics of ion counting and ion source fluctuations are the main parameters affecting the precision in isotope ratio measurements when working in ion counting mode [25]. In single collector (ICP)MS work, the isotope ratio precision follows Poisson statistics for low counting rates, improves for high ion counting rates and is finally limited by plasma fluctuations [25]. The precision in the experimental isotope ratios, expressed as RSD (%) for $n=3$ injections of spiked samples and standards, is shown in Fig. 3 as a function of the measured area at $m/z=79$ for both instruments. The grey points correspond to the theoretical RSD(%) based on the Poisson distribution for each data point calculated as:

$$\frac{s_R}{R} (\%) = 100 \times \sqrt{\frac{1}{I_{79}} + \frac{1}{I_{81}}}$$

Fig. 2 Isotope ratios $^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ measured in the Agilent and Shimadzu instruments as peak area ratios at different PBDE concentration levels. Single injections at each concentration level

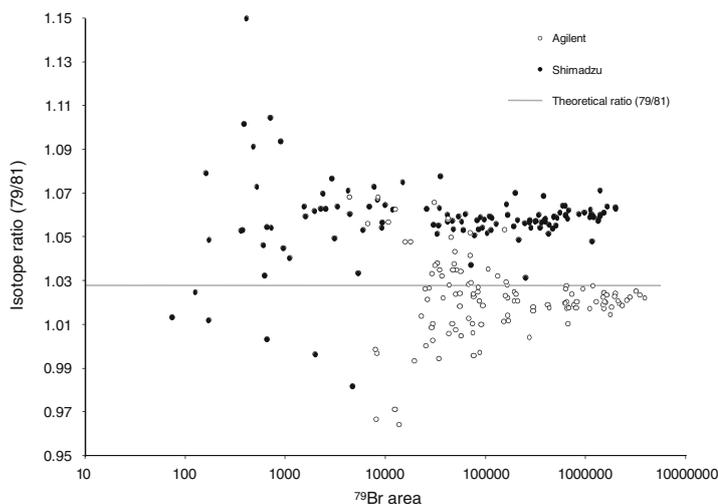
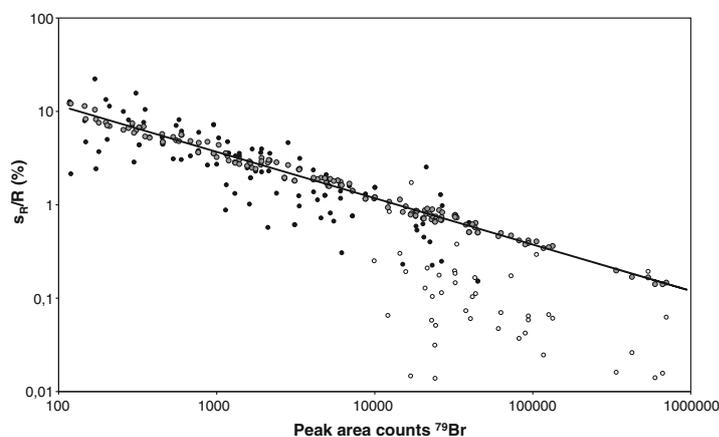


Fig. 3 Variation of the relative standard deviation (%) on the measured isotope ratios in spiked samples ($n=3$ injections) with the peak areas measured for ^{79}Br in both analytical instruments. Data and legends as in Fig. 2. The grey points correspond to the theoretical values for a Poisson distribution and the solid line is the best fit for the theoretical values



The best fit of the theoretical Poisson distribution is shown as the solid line. As can be observed, the precision follows approximately the theoretical curve for both instruments showing RSD values below 1% for ^{79}Br areas higher than ca. 10,000 counts and below 0.1% when areas increase above 1,000,000 counts as predicted by Poisson statistics. In all cases, the areas for ^{81}Br were higher than those for ^{79}Br (spiked samples). So, ion source fluctuations show a negligible contribution to the observed reproducibility in contrast to other elemental ion sources (such as the ICP) where isotope ratio precisions in GC(ICP)MS mode rarely go below 0.5% regardless of the measured ion counts [25].

Characterisation of the ^{81}Br -labelled PBDEs spike

The concentration, isotope composition and stability of the labelled spike were described previously [22, 23]. In brief, the crude synthetic mixture, containing large amounts of BDE-47 with respect to the other congeners, was characterised in isotope composition by GC(ICP)MS showing an isotope enrichment of 99.53% for ^{81}Br in BDE-47 [22].

After preparative reverse-phase HPLC separation and pre-concentration, a second mixture was prepared containing similar amounts of BDEs 28, 47, 99, 100, 153 and 154. This second mixture was characterised both in isotope composition and concentration by GC(EI)MS [23]. It was observed that BDEs 28, 47, 99 and 100 showed an isotope enrichment similar to that measured previously for BDE-47 by GC(ICP)MS. However, both BDE 153 and 154 showed a mass isotopomer profile that was consistent with the isotopic enrichment of the other congeners but contaminated with the presence of 41.8% BDE-153 and 24.4% BDE-154 of natural isotopic composition. In order to confirm these results, the ^{81}Br -labelled PBDE standard was injected in the Shimadzu GC(ECNI)MS instrument. The obtained results, corrected for mass bias using a natural abundance PBDE standard, are summarized in Table 2 in comparison with those measured using other ion sources. As can be observed, the measured isotope composition for BDE-47 matches that determined by GC(ICP)MS and that calculated by GC(EI)MS. For the other PBDEs, similar results were obtained by GC(EI)MS and GC(ECNI)MS. Please note that

Table 2 Bromine isotope enrichment for the labelled PBDEs measured with different ion sources

Congener	Isotope abundance ^{81}Br (%)			Concentration (ng/g) GC(EI)MS ²³
	GC(ICP)MS	GC(EI)MS ^a	GC(ECNI)MS	
BDE-28 (2,4,4' - tri BDE)	–	99.0±0.3	99.36±0.01	378±15
BDE-47 (2,2',4,4' - tetra BDE)	99.53±0.02	99.3±0.3	99.53±0.01	1,810±75
BDE-99 (2,2',4,4',5 - penta BDE)	–	99.0±0.5	99.28±0.02	313±8
BDE-100 (2,2',4,4',6 - penta BDE)	–	98.2±0.5	99.38±0.03	169±4
BDE-153 (2,2',4,4',5, 5' - hexa BDE)	–	78.6±0.9	80.5±0.2	372±16
BDE-154 (2,2',4,4',5,6' - hexa BDE)	–	87.3±5.9	89.0±0.3	28±2

Their concentrations were determined by reverse IDMS²³

^a Calculated by least squares optimisation by comparison of experimental and calculated profiles

with GC(EI)MS, the isotopic compositions are not measured directly but calculated by least squares optimisation in the measured isotope profile of the molecular ion in comparison with theoretically calculated isotope patterns. The concentrations of the PBDEs in the spike were determined by reverse isotope dilution analysis, using SRM 2257 as reference, by GC(EI)MS [23] and are also included in Table 2. This spike was shown to be stable for over 4 months and no isotope exchange between bromine atoms from the natural abundance PBDEs and the labelled spike was detected [23].

Optimisation of the IDMS procedure

The optimum sample to spike ratio needs to be selected when studying any IDMS procedure. In this regard, the random error propagation theory must be taken into account in order to achieve good precision in the results obtained by IDMS [25]. In the absence of other relevant uncertainty sources, the relative uncertainties associated to the concentrations depend mainly on the relative uncertainties of the measured isotope ratios in the mixture, R_m , following the expression [31]:

$$\left[\frac{s(C_s)}{C_s} \right] = \left[\frac{R_m(1 - R_{sp}R_s)}{(R_m - R_{sp})(1 - R_mR_s)} \right] \left[\frac{s(R_m)}{R_m} \right]$$

Where $s(C_s)/C_s$ is the relative error in the determined concentration, $s(R_m)/R_m$ the relative error in the measured isotope ratio in the mixture of natural and labelled compounds. The other term in the equation is the so-called error magnification factor, which depends on R_m (isotope ratio in the mixture), R_s (isotope ratio in the sample of natural abundance), and R_{sp} (isotope ratio in the spike). As R_s and R_{sp} are constant for a particular element and labelled standard, only R_m can be optimised to minimize the error magnification factor. That means that the amount of spike added to the sample must be optimised in order to obtain adequate isotope ratios in the mixture. Therefore, a previous approximate knowledge of the concentration of the element in the sample is required to select the optimum amount of spike to be added.

Using the data shown in Table 2 for GC(ECNI)MS, three different isotope ratios in the spike were obtained. A R_{sp} value of ca. 0.006 for BDEs 28, 47, 99 and 100 and values of 0.242 and 0.124 for BDEs 153 and 154, respectively because of the natural contamination. As bromine natural abundances are well known [32], the error magnification factor can be minimized as a function of R_m . The error magnification curves obtained for our labelled standard are shown in Fig. 4. As can be seen, for BDEs 28, 47, 99 and 100, R_m values between 0.02 and 0.50 provide error magnification factors below 2, which can be considered

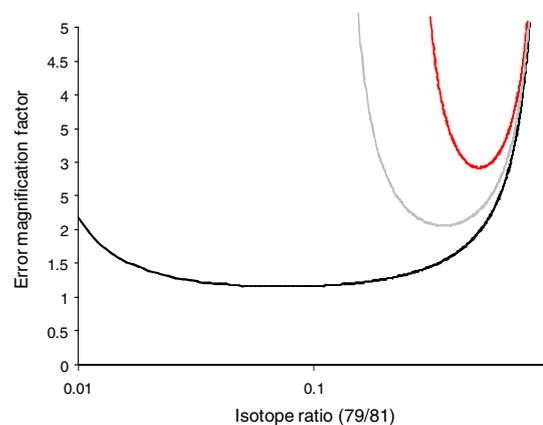


Fig. 4 Variation of the error magnification factor with R_m for BDEs 28, 47, 99 and 100 (solid black line), 154 (grey line) and 153 (red line)

acceptable, showing a minimum error magnification factor of 1.15 around $R_m=0.08$. These R_m values correspond to natural to labelled concentration ratios in the range of 1:35–1:0.5, respectively with the minimum error magnification factor for a ratio of ca. 1:6. Unfortunately, for BDEs 153 and 154 the optimum range in the error magnification curves is much narrower with higher propagated error as can be observed in the figure.

Evaluation of the ID-GC(ECNI)MS procedure for the determination of PBDEs

Once the GC(ECNI)MS system was evaluated and working conditions were optimised for its use in isotope ratio measurements, the proposed methodology consisting of the determination of the six priority PBDEs in environmental and biological samples, was validated by using a standard reference material (Lake Michigan fish tissue SRM 1947). BDE 49 was also included in the validation stage as it was present in the labelled standard and it was one of the certified congeners in the reference material. Samples were treated as described at the procedures section. Two independent samples and a blank were analysed at three different and increasing spike levels (indicated as blend 1, blend 2 and blend 3) in order to detect possible systematic errors in the procedure.

The concentrations of the BDE congeners in the SRM 1947 samples were obtained by using the elemental isotope dilution equation [25]. The obtained concentrations were in agreement with the certified values [33] for the seven congeners at the three studied spike levels (Table 3) with the exception of BDE-154 in blends 1 and 3. Recoveries were between 90% and 105% for congeners 47, 49, 99, 100 and 153. BDE-28+33 showed recoveries of about 80% for the three studied spiked samples. However, it must be taken

Table 3 Concentrations of PBDEs in SRM 1947 determined by ID-GC(ECNI) MS

Congener	Concentration (ng·g ⁻¹)			Certified concentration (ng·g ⁻¹)
	Blend 1	Blend 2	Blend 3	
BDE-28+33	1.9±0.2	1.8±0.2	1.8±0.2	2.26±0.46 ^a
BDE-47	72.3±5.5	70.0±5.3	71.7±6.1	73.3±2.9
BDE-49	3.7±0.8	3.6±0.8	3.6±0.8	4.01±0.1
BDE-99	19.1±1.0	18.3±1.0	18.8±1.2	19.2±0.8
BDE-100	17.7±1.0	17.0±1.0	17.4±1.2	17.1±0.6
BDE-153	4.0±0.3	3.7±0.9	4.2±0.5	3.83±0.04
BDE-154	8.5±1.4	8.2±1.3	8.5±1.2	6.88±0.52

Mean values correspond to two separate extractions measured $n=5$ times each. Uncertainties correspond to expanded uncertainties ($k=2$)

^aNot certified

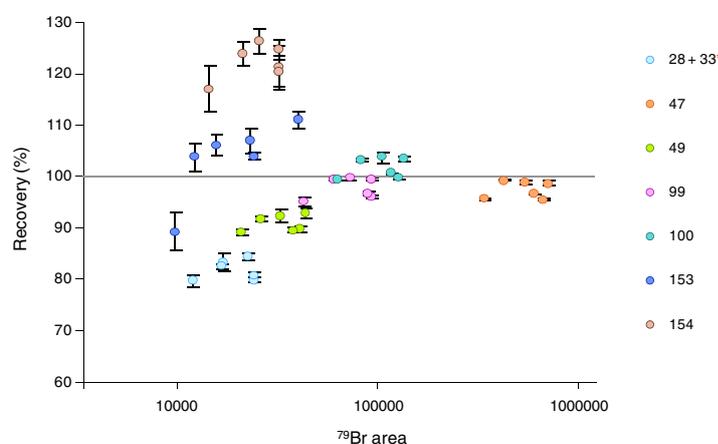
into account that the reference value for BDE 28 was, due to coelution, actually given for the sum of BDEs 28 and 33. BDE-154 showed high recoveries in the range of 120–125% for the three studied spiked samples. This could be due to coelution with an unknown brominated compound (e.g. BB-153). The variability in the results, expressed in terms of expanded uncertainties, were calculated following the Kragten spreadsheet method [34] and taking into account all parameters involved in the calculation of the final concentrations and their respective uncertainties. The same results for the three different blends and duplicate samples are shown in Fig. 5 as a function of the obtained peak area for ⁷⁹Br. As can be observed, the results follow a similar trend that the isotope ratios given in Fig. 2: increasing variability at lower counts with recoveries in the range 80–120%.

The experimental reproducibilities of the measured concentrations between different samples of each blend were calculated as RSD (%). All the values found were always below 4%, although RSDs lower than 2% were obtained for the lower brominated congeners (tri-, tetra- and penta-) in the three blends. Detection limits were calculated from the variation in the three blank measurements performed during the analysis of the reference material.

Detection limits between 0.02 and 0.4 ng·g⁻¹, expressed as three times the standard deviation of the three measured blanks ($n=5$), were obtained.

Determination of PBDEs in river water samples

Finally, the validated methodology was applied to the determination of the six priority PBDEs (28, 47, 99, 100, 153 and 154) [12] in river water samples. The samples were collected in July 2010 along the River Nalón, which was selected for this work as it is the longest and most important river in the Autonomous Community of Asturias (4,830 km² of basin surface covering 46% of the Asturian territory). Different sampling points were selected along the river, beyond its confluence with each of its main four tributaries (Rivers Caudal, Trubia, Nora and Narcea) in order to better estimate the possible location area of the BDEs contamination source. Two separate samples were collected at each sampling site and one sample from each site was spiked with weight with a mixture of the six priority PBDEs in methanol for recovery purposes, at the concentration set by the Water Framework Directive (WFD) as Environmental Quality Standard (EQS) for inland surface waters (0.5 pg g⁻¹) [12].

Fig. 5 Recovery of PBDEs from NIST SRM 1947 as a function of the area counts observed for ⁷⁹Br


Ultra-trace levels of priority PBDEs in water samples

Table 4 PBDE recoveries in milli-Q water samples spiked at different concentration levels

Congener	Recovery (%)				
	0.2 pg·g ⁻¹	0.5 pg·g ⁻¹	1 pg·g ⁻¹	5 pg·g ⁻¹	10 pg·g ⁻¹
BDE-28	84.7±2.4	89.3±1.6	91.6±0.8	95.8±1.6	92.7±1.6
BDE-47	77.9±1.4	84.4±1.3	87.4±0.8	97.5±0.8	95.2±0.6
BDE-99	83.6±1.8	90.7±1.2	93.5±0.7	98.9±1.6	98.2±1.7
BDE-100	83.7±2.9	93.1±0.7	95.0±1.2	97.8±3.2	99.1±5.0
BDE-153	62±11	78.2±1.9	84.8±4.9	96.2±4.6	95.8±3.9
BDE-154	84±12	82.8±2.7	82.9±5.7	92±32	94±37

The uncertainty is indicated as standard deviation for n=5 independent samples

In order to evaluate the analytical characteristics of the proposed methodology milli-Q water samples were also fortified by weight with a mixture of natural abundance of the six priority PBDEs in methanol at different concentration levels (from 0.2 to 10 pg g⁻¹). All samples (river and milli-Q water) were treated as indicated at the procedure section and spiked with the same amount of the ⁸¹Br-labelled standard. Concentrations were obtained by using the elemental isotope dilution equation [25] and mass bias correction was carried out by using a natural abundance standard mixture containing the six PBDEs of primary interest and the average natural isotopic abundances of bromine published by the IUPAC [32] as reference.

Table 4 shows the recoveries obtained for milli-Q water samples spiked at different concentration levels. Recoveries at 0.2 pg g⁻¹ could be considered acceptable for such concentration level. For samples spiked at the EQS level (0.5 pg g⁻¹) recoveries were in the range of 78–93%. For samples spiked at the higher levels of 1, 5 and 10 pg g⁻¹ recoveries were between 83% and 99%. Table 5 shows the limits of quantification, expressed as ten times the standard deviation of ten individual blanks and the precision, in terms of repeatability and reproducibility, expressed as RSD (%). The limits of quantification obtained are below the EQS required by the WFD. Good precisions (below 4% RSD) were obtained for all congeners except for BDE-154 at the two studied concentration levels. The higher RSDs

found for this congener at 5 pg g⁻¹ can be due to its low concentration in the ⁸¹Br-labelled standard (10–100 times lower than the other congeners). As the same amount of ⁸¹Br-labelled standard was added to all the samples for an expected concentration of around 0.5–1 pg·g⁻¹ for each congener, measured isotope ratios for BDE-154 in this blend were around 1, very close to the natural abundance isotope ratio and, therefore, completely out of the range which minimizes error propagation (see Fig. 4).

Finally, the six priority congeners of interest were determined in the river water samples. Obtained concentrations for both, fortified and non fortified river water samples are summarized in Table 6. Concentration values were reported when the corresponding congener was present at a concentration that was above the limit of detection even if that concentration was below the LOQ because those data can provide an estimate of the LOQs in real samples confirming the LOQs obtained with blank experiments. The variability in the results is expressed in terms of expanded uncertainties, following the Kragten method [34]. As can be seen, concentrations found for non fortified samples are below the limits of detection (n.d.) for most congeners in several samples. In general, when detected, concentrations were of the order or lower than the LOQs (Table 5) and so, their values were lower than their expanded uncertainties. The obtained concentrations were always below the annual average Environmental

Table 5 PBDE limits of quantification (LOQ) and precision at 0.5 and 5 pg g⁻¹ in milli-Q water samples

Congener	LOQ (pg·g ⁻¹)	Precision at 0.5 pg·g ⁻¹ (%RSD)		Precision at 5 pg·g ⁻¹ (%RSD)	
		Repeatability ^a	Reproducibility ^b	Repeatability ^a	Reproducibility ^b
BDE-47	0.30	1.4	1.5	0.5	0.4
BDE-99	0.05	0.6	1.4	0.8	1.0
BDE-100	0.05	1.6	0.8	2.6	2.7
BDE-153	0.28	2.0	2.5	2.5	3.9
BDE-154	0.06	6.3	3.3	26	17

^am=5 injections of the same sample

^bn=3 individual samples

Table 6 Determination of BDEs 28, 47, 99, 100, 153 and 154 in five river water samples from River Nalón

Congener	S1	S2	S3	S4	S5
River water samples					
BDE-28	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
BDE-47	n. d.	n. d.	n. d.	0.1±0.4	n. d.
BDE-99	0.03±0.07	0.06±0.08	0.04±0.05	0.1±0.2	n. d.
BDE-100	0.02±0.06	0.02±0.07	0.02±0.04	0.1±0.2	n. d.
BDE-153	n. d.	n. d.	n. d.	0.1±0.2	n. d.
BDE-154	0.02±0.04	0.04±0.05	n. d.	0.1±0.2	n. d.
Fortified river water samples					
BDE-28	0.52±0.02 (93.3)	0.5±0.1 (95.1)	0.51±0.08 (91.6)	0.50±0.05 (91.7)	0.50±0.01 (90.8)
BDE-47	0.49±0.02 (85.2)	0.54±0.07 (94.2)	0.51±0.06 (88.7)	0.49±0.05 (86.7)	0.54±0.03 (94.7)
BDE-99	0.50±0.02 (90.4)	0.57±0.09 (101.7)	0.54±0.05 (96.9)	0.51±0.03 (92.9)	0.49±0.03 (88.1)
BDE-100	0.48±0.02 (88.6)	0.51±0.06 (91.4)	0.47±0.05 (85.2)	0.46±0.02 (85.2)	0.47±0.02 (85.8)
BDE-153	0.5±0.2 (91.2)	0.46±0.08 (81.3)	0.44±0.04 (78.5)	0.5±0.2 (89.0)	0.5±0.1 (80.7)
BDE-154	0.4±0.1 (76.9)	0.4±0.2 (86.1)	0.4±0.2 (82.2)	0.4±0.1 (83.9)	0.6±0.2 (83.4)

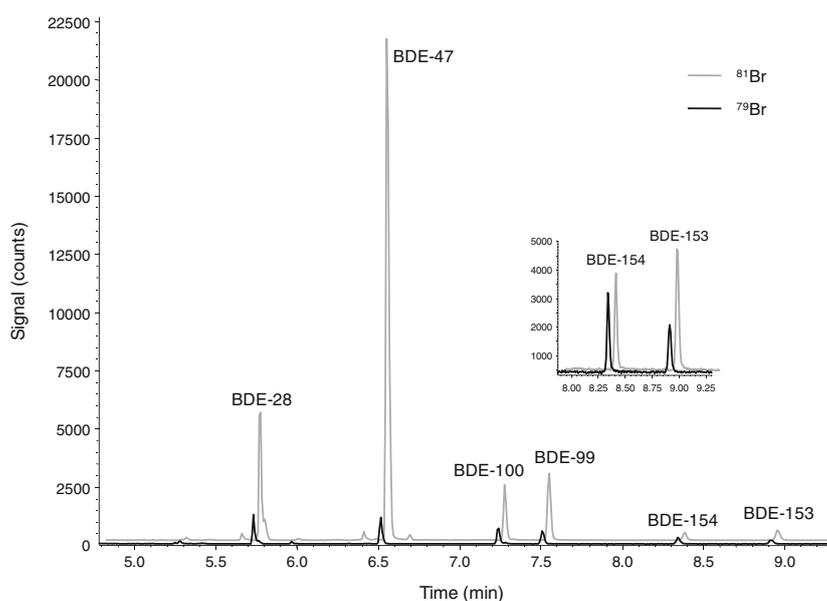
Uncertainties correspond to expanded uncertainties ($k=2$). Bottom: concentrations and recoveries (%) from fortified samples at the EQS level

Quality Standard set by the WFD [12]. The most contaminated sample was sample S4 taken just downstream from the merging of the Nora tributary. As exemplified by the fortified (0.5 pg g^{-1}) sample S5, very clean chromatograms can be obtained with ECNI (Fig. 6). Concentrations together with their respective expanded uncertainties are also shown in Table 6 for the fortified river water samples. Satisfactory recoveries (in brackets), in the range 77–102%, were found for the six priority congeners. For future studies other extraction solvents will need to be evaluated to check the extraction of particle-bound PBDEs.

Conclusions

A procedure for the determination of the six priority PBDE congeners in water samples at regulatory EU levels has been developed. In comparison with the GC(EI)MS procedure previously described [23] the method does not permit compound identification by fragment ions but provides much improved sensitivity suitable for the determination of very low levels of PBDEs in water samples. Detection limits and recoveries at the EQS level are within those required by the legislation. The method is

Fig. 6 Chromatogram of a fortified (at the EQS level) real sample of river water (S5) after spiking with the ^{81}Br -labelled spike



Ultra-trace levels of priority PBDEs in water samples

fast and simple to perform and does not require the construction of a methodological calibration graph as it uses the classical elemental isotope dilution equation. During method development, the performance of the ECNI source for bromine isotope ratio measurements was evaluated with satisfactory results in terms of isotope ratio precision and accuracy. The ^{81}Br -labelled compounds will be available commercially in the near future.

Acknowledgement The work described in this paper was supported by the Ministry of Science and Innovation, Madrid, Spain (project ref. CTQ2009-12814)

References

- Rahman F, Langford KH, Scrimshaw MD, Lester JN (2001) *Sci Tot Env* 275:1–17
- U.S. Environmental Protection Agency. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) Project Plan March 2006.
- Vonderheide AP, Montes-Bayón M, Caruso JAJ (2002) *Anal At Spectrom* 17:1480–1485
- Zhou J, Yang F, Cha D, Zeng Z, Xu Y (2007) *Talanta* 73:870–877
- WHO/IPCS. Environmental health criteria 162. Brominated diphenyl ethers. Geneva, Switzerland: World Health Organization
- Hale RC, Alae M, Manchester-Neesvig JB, Stapleton HM, Ikonou MG (2003) *Environ Int* 29:771–779
- Lagalante AF, Oswald TD (2008) *Anal Bioanal Chem* 391:2249–2256
- Wolkers H, Van Bavel B, Derocher AE, Wiig Ø, Kovacs KM, Lydersen C, Lindström G (2004) *Environ Sci Technol* 38:1667–1674
- Swarthout RF Jr, Kucklick JR, Davis WCJ (2008) *Anal At Spectrom* 23:1575–1580
- Domingo JLJ (2004) *Chromatogr A* 1054:321–326
- Costa LG, Giordano G, Tagliaferri S, Caglieri A, Mutti A (2008) *Acta Biomed* 79:172–183
- Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, *Official Journal Of the European Communities*, 24.12.2008 348:84–97
- European Food Safety Authority (2006) *The EFSA Journal* 328:1–4
- Covaci A, Voorspoels S, de Boer J (2003) *Environ Int* 29:735–756
- Eljarrat E, Barceló D (2004) *Trend Anal Chem* 23:727–736
- US EPA Method 1614: Brominated Diphenyl Ethers in Waste Soil, Sediment and Tissue by HRGC/HRMS, US Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology Engineering and Analysis Division, Washington, DC (2007) (EPA-821-R-07-005)
- Ackerman LK, Wilson GR, Simonich SL (2005) *Anal Chem* 77:1979–1987
- Peng JH, Huang CW, Weng YM, Yak HK (2007) *Chemosphere* 66:1990–1997
- Covaci A, de Boer J, Ryan JJ, Voorspoels S, Schepens P (2002) *Anal Chem* 74:790–798
- Sjödin A, Jakobsson E, Kierkegaard A, Marsh G, Sellström UJ (1998) *Chromatogr A* 822:83–89
- Stapleton HM, Keller JM, Schantz MM, Kucklick JR, Leigh SD, Wise SA (2007) *Anal Bioanal Chem* 387:2365–2379
- González-Gago A, Marchante-Gayón JM, Ferrero M, Garcia Alonso JI (2010) *Anal Chem* 82:2879–2887
- González-Gago A, Marchante-Gayón JM, Garcia Alonso JI (2011) *Anal Chem* 83:3024–3032
- De Boer J, Allchin C, Law R, Zegers B, Boon JP (2001) *Trends Anal Chem* 20:591–599
- Rodríguez-González P, Marchante-Gayón JM, Garcia Alonso JI, Sanz-Medel A (2005) *Spectrochim Acta B* 60:151–207
- Poperechna N, Heumann KG (2005) *Anal Chem* 77:511–516
- Poperechna N, Heumann KG (2005) *Anal Bioanal Chem* 383:153–159
- Heilmann J, Heumann KG (2008) *Anal Bioanal Chem* 390:643–653
- Giese RWJ (2000) *Chromatogr A* 892:329–346
- Stemmier EA, Hites RA, Arbogast B, Budde WL, Deinzer ML, Dougherty RC, Eichelberger JW, Foltz RL, Grimm C, Grimsrud EP, Sakashita C, Sears LJ (1988) *Anal Chem* 60:781–787
- Heumann KG (1988) Isotope dilution mass spectrometry. In: Adams F, Gijbels R, Van Grieken R (eds) *Inorganic mass spectrometry*. Wiley, New York, pp 301–376
- Böhlke JK, de Laeter JR, De Bièvre P, Hidaka H, Peiser HS, Rosman KJR, Taylor PDPJ (2005) *Phys Chem Ref Data* 34:57–67
- http://www.irmm.jrc.be/reference_materials_catalogue/user_support/Pages/index.aspx
- Kragten J (1994) *Analyst* 119:2161–2165

D.3.4 Discusión de los resultados

La publicación científica que lleva por título *Determination of priority Polybrominated Diphenyl Ethers by isotope dilution Gas Chromatography(Electron Ionization)MS using ⁸¹Br-labeled standards* incluida en la sección D.3.3.1 recoge los principales resultados, discusiones y conclusiones sobre los objetivos numerados del 1 al 5 en este capítulo, mientras que los resultados, discusiones y conclusiones relativos a los objetivos numerados de 6 a 10 están recogidos en artículo titulado *Determination of ultra-trace levels of priority PBDEs in water samples by isotope dilution GC-(ECNI)MS using ⁸¹Br-labelled standards* incluido en la sección D.3.3.2.

Sin embargo hay algunos aspectos que no han sido discutidos en estas publicaciones por lo que serán tratados a continuación.

D.3.4.1 Comparación entre las metodologías desarrolladas para la determinación de PBDEs prioritarios

En este capítulo se han desarrollado dos metodologías alternativas para la determinación de los PBDEs clasificados como prioritarios en distintos tipos de muestras de interés medioambiental. Ambas metodologías se basan en la estrategia de IDA con detección por MS. Sin embargo, existen importantes diferencias entre ellas que hacen que cada una resulte más o menos adecuada según el tipo de muestra a analizar.

Como ya se ha mencionado anteriormente, una de las principales ventajas que ofrece en uso de trazadores marcados isotópicamente con heteroátomos es que ofrecen la posibilidad de utilizar diferentes fuentes de ionización en MS. En el caso concreto de los PBDEs la posibilidad de marcarlos con ⁸¹Br supone una gran ventaja ya que permite desarrollar métodos de IDA utilizando cualquiera de las principales fuentes de ionización empleadas para la determinación de estos compuestos por MS, que son EI, NCI y en algunas ocasiones ICP, con analizadores de masas de baja resolución.¹

La fuente de ionización EI destaca porque permite identificar y confirmar la presencia de los PBDEs a través de su espectro de masas, caracterizado por constar de dos fragmentos moleculares más intensos, correspondientes al ion molecular (M^+) y al generado por la pérdida de dos átomos de Br ($M-2Br^+$), junto con otros de menor

importancia. Por lo general, para los congéneres correspondientes a los grupos homólogos con grados de bromación iguales o inferiores a cuatro el ion molecular es el fragmento predominante mientras que para los que presentan grados de bromación más elevados el fragmento con señal más intensa es el otro,² aunque este comportamiento puede variar ligeramente según las posiciones sustituidas en cada congénere³ y las condiciones experimentales concretas, por lo que para una identificación inequívoca de los analitos resulta necesario comparar su espectro de masas con el obtenido para un patrón natural de la misma sustancia. Por otro lado, cuando se ionizan los PBDEs marcados en ⁸¹Br los fragmentos moleculares principales son los mismos, aunque se observa que, para el mismo congénere, el pico más intenso corresponde al ion molecular. La *Figura 46* muestra un ejemplo del espectro de masas adquirido en el modo de barrido para el congénere BDE-47 natural y marcado en las mismas condiciones experimentales de trabajo.

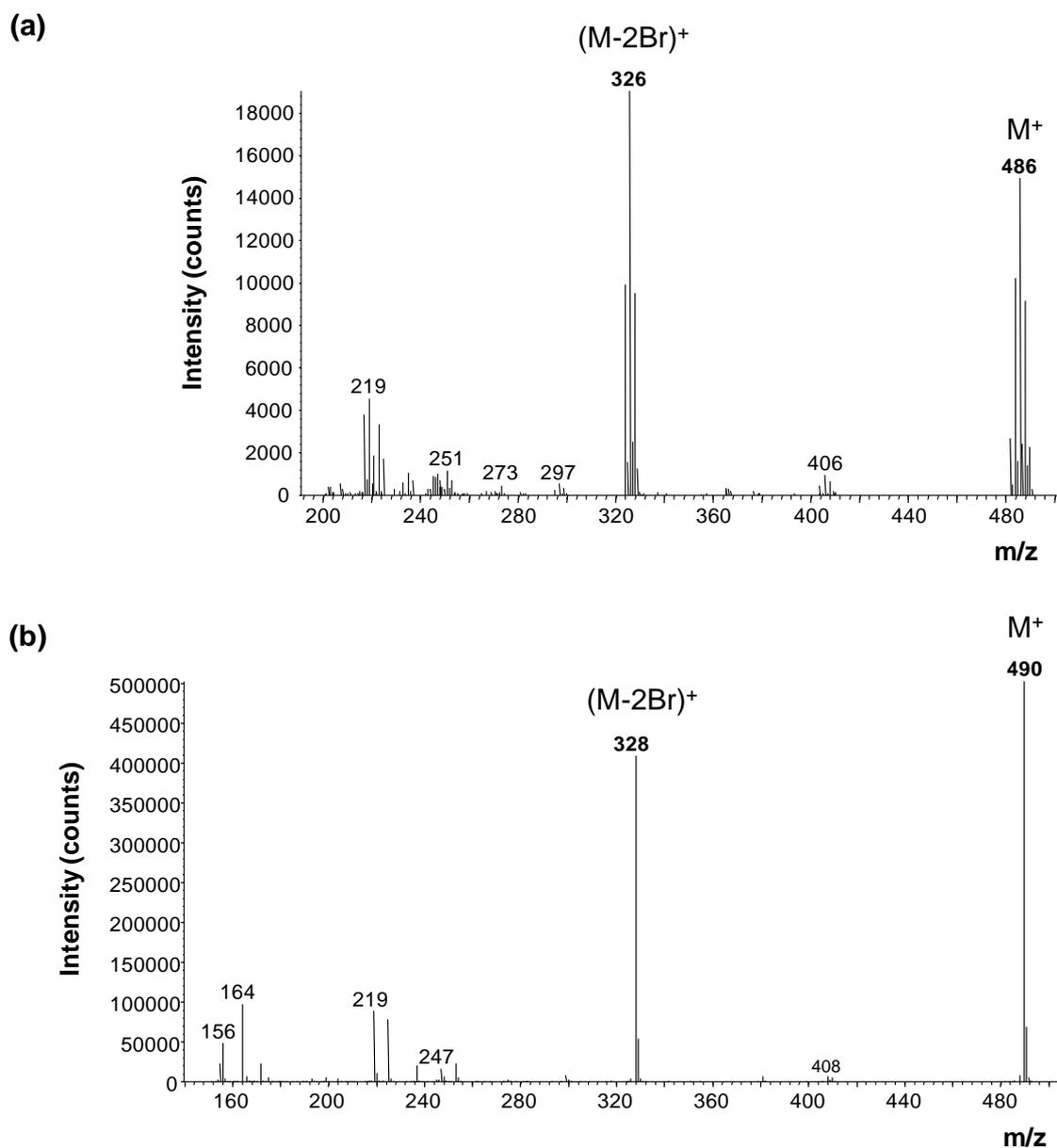


Figura 46. Espectros de masas obtenidos mediante GC-(EI)MS para el congénere BDE-47

(a) Natural y (b) Marcado isotópicamente en ⁸¹Br

Esta diferencia de comportamiento entre los compuestos con abundancias naturales y los marcados isotópicamente no se debe a efectos isotópicos sino que es consecuencia de que, para el congénere de abundancias naturales se produce una mayor distribución de la señal en el clúster correspondiente al ion molecular mientras que para el congénere marcado en ⁸¹Br casi toda la señal se concentra en una determinada relación m/z.

Así, con la fuente EI es posible llevar a cabo la cuantificación de los PBDEs mediante IDA específico además de confirmar su presencia en una determinada muestra. Por

tanto, la técnica GC-(EI)MS resulta ideal para la determinación de PBDEs en distintas muestras. Sin embargo, esta técnica no presenta muy buena sensibilidad para los PBDEs cuando se trabaja con analizadores de masas de baja resolución, especialmente para aquellos congéneres que presentan grados de bromación más altos,¹ por lo que en la práctica resulta adecuada en aquellos casos en los que las muestras no presenten niveles de concentración demasiado bajos o cuando tengan matrices complicadas que puedan contener otras sustancias con características fisicoquímicas semejantes a las de los PBDEs y que puedan coeluir con ellos, como los PCBs o los PBBs.⁴ Las muestras de origen biológico, los lodos y sedimentos son un buen ejemplo ya que, como se ha indicado, tienden a presentar niveles más elevados de PBDEs y también de otras sustancias organohalogenadas.

En el artículo incluido en la sección D.3.3.1 se puede ver que el método de IDA molecular desarrollado para la determinación de PBDEs mediante GC-(EI)MS resulta muy adecuado para el análisis de muestras de pescado con concentraciones a niveles de ultratrazas, mostrando muy buenas características analíticas en términos de exactitud, con recuperaciones dentro del rango 89-116%, precisiones inferiores al 3% en la mayoría de los casos, y LDs del orden de 0,05-0,9 ng·g⁻¹ para los congéneres prioritarios. Los LDs que ofrece este método son comparables a los que se obtienen con otros métodos descritos en la bibliografía que llevan a cabo la determinación de PBDEs por GC-(EI)MS en baja resolución, aunque por lo general presenta precisiones bastante superiores a las que aparecen en la bibliografía (ver tablas en la sección A.2.1.2.2).

Por otro lado, la cuantificación a través de la metodología propuesta en el artículo incluido en la sección D.3.3.1 requiere la medida de la señal para varias relaciones m/z pertenecientes al clúster seleccionado para llevar a cabo la cuantificación. Como ya se ha comentado en la sección C.3.2.2.2, para poder obtener las fracciones molares del analito y el trazador que permiten calcular la concentración del analito en la muestra es necesario medir la señal al menos para dos relaciones m/z, idealmente una de ellas debe ser representativa del trazador y la otra del analito. Sin embargo, si se miden la señal de m/z adicionales es posible calcular las incertidumbres asociadas a las fracciones molares (ver sección C.3.2.3.1) y cuanto mayor sea el número de masas medidas, mejor es el ajuste realizado mediante mínimos cuadrados múltiples para la obtención de las fracciones molares. Además, cuando se trabaja con el clúster correspondiente al ion molecular es posible detectar la presencia de sustancias

interferentes que estén afectando a la señal medida para la cuantificación de la sustancia de interés siempre que se midan al menos dos masas para el analito y dos masas para el trazador. Esto es posible debido a que la sustancia interferente, aunque coincida en masa con el analito o el trazador suele presentar, por lo general, una fórmula molecular distinta a la de la sustancia de interés, por lo que su perfil isotópico también será diferente. Este sistema sirvió para detectar la presencia de un interferente que afecta a la determinación del congénere BDE-28+33 en el material de referencia SRM 1947 *Lake Michigan Fish Tissue*. En este caso se observó que el clúster de medida presentaba abundancias relativas alteradas de modo que no conservaba el perfil típico de las mezclas entre muestra y trazador. A la hora de realizar los cálculos mediante IPD se observó que el ajuste de la regresión no era bueno, ya que la presencia de una sustancia desconocida que coeluye con el compuesto de interés hace que la señal de la mezcla no sea una combinación lineal del perfil isotópico del analito y el trazador sino que tiene también una contribución proveniente del interferente. Al no incluir el perfil isotópico del interferente para realizar el ajuste por mínimos cuadrados múltiples se obtuvo un mal ajuste que dio lugar a valores residuales elevados. La *Figura 47* muestra el ajuste para este congénere.

Cabe destacar que esta metodología permite detectar únicamente interferentes con fórmula molecular (para toda la molécula o para alguno de sus fragmentos) diferente a la del analito, ya que los compuestos que tengan la misma fórmula molecular, como por ejemplo otros congéneres correspondientes al mismo grupo homólogo, presentan el mismo perfil isotópico, por lo que no será posible detectar su presencia y en ese caso la fracción molar corresponde a la suma de las fracciones molares de todos los congéneres que coeluyan (BDE-28+33). La *Figura 47* ilustra este caso.

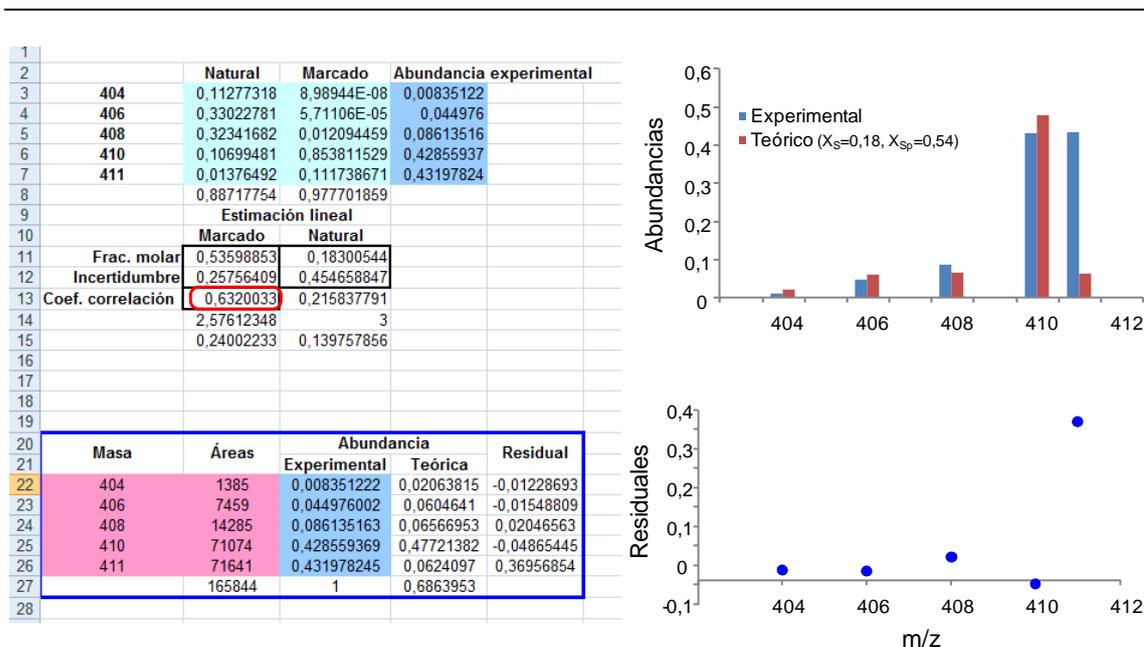


Figura 47. Ajuste de la señal obtenida para BDE-28+33 mediante mínimos cuadrados múltiples

Por todo ello esta metodología resulta muy adecuada para la determinación de PBDEs en ciertos tipos de muestras. Sin embargo, algunas muestras, como por ejemplo las de agua, presentan muy bajos niveles de concentración de PBDEs, por lo que será necesario utilizar mayores volúmenes de muestra, técnicas que permitan obtener factores de preconcentración más elevados o técnicas de MS que proporcionen mayor sensibilidad en la medida de estas sustancias. En la *Tabla 42*⁵ se comparan las características de las principales técnicas de MS empleadas en la determinación de PBDEs.

Tabla 42. Comparación de las características de las principales técnicas de MS utilizadas para la determinación de PBDEs

Técnica	Sensibilidad	Identificación	Exactitud	Coste
(ECNI)MS	++	+ (ión Br ⁻)	++ (IS)	+
(EI)MS	+	++ (masa molecular nominal)	+++ (IDA)	+
(EI)HRMS	+++	++ (masa molecular exacta)	+++ (IDA)	+++
IT-MS/MS	+	++ (masa molecular nominal)	+++ (IDA)	+
QTrap-MS/MS	++	++ (masa molecular nominal)	+++ (IDA)	+

+: bajo, ++: medio, +++: alto

Como se puede observar, la mayor sensibilidad y la mejor selectividad se obtienen cuando se recurre a analizadores de masas de alta resolución. Sin embargo esta técnica presenta algunas desventajas importantes, ya que resulta muy cara y su manejo es complicado, dificultando así su utilización en métodos de rutina. Las técnicas que presentan una sensibilidad media pueden ser adecuadas para la determinación de bajos niveles de PBDEs si se utiliza una cantidad de muestra adecuada y se preconcentra lo suficiente.

Dentro de las opciones que ofrecen los analizadores de masas de baja resolución la técnica de (NCI)MS destaca por su selectividad hacia los compuestos aromáticos bromados así como por su sensibilidad derivada de alta eficiencia de ionización de compuestos con alta carga de Br a través del mecanismo de ECNI. Además, esta técnica emplea la misma instrumentación que (EI)MS siendo necesario únicamente intercambiar una fuente de ionización por otra. La *Figura 48* muestra un equipo de GC-MS que puede trabajar en el modo EI o NCI según la fuente de ionización instalada en función de las necesidades.

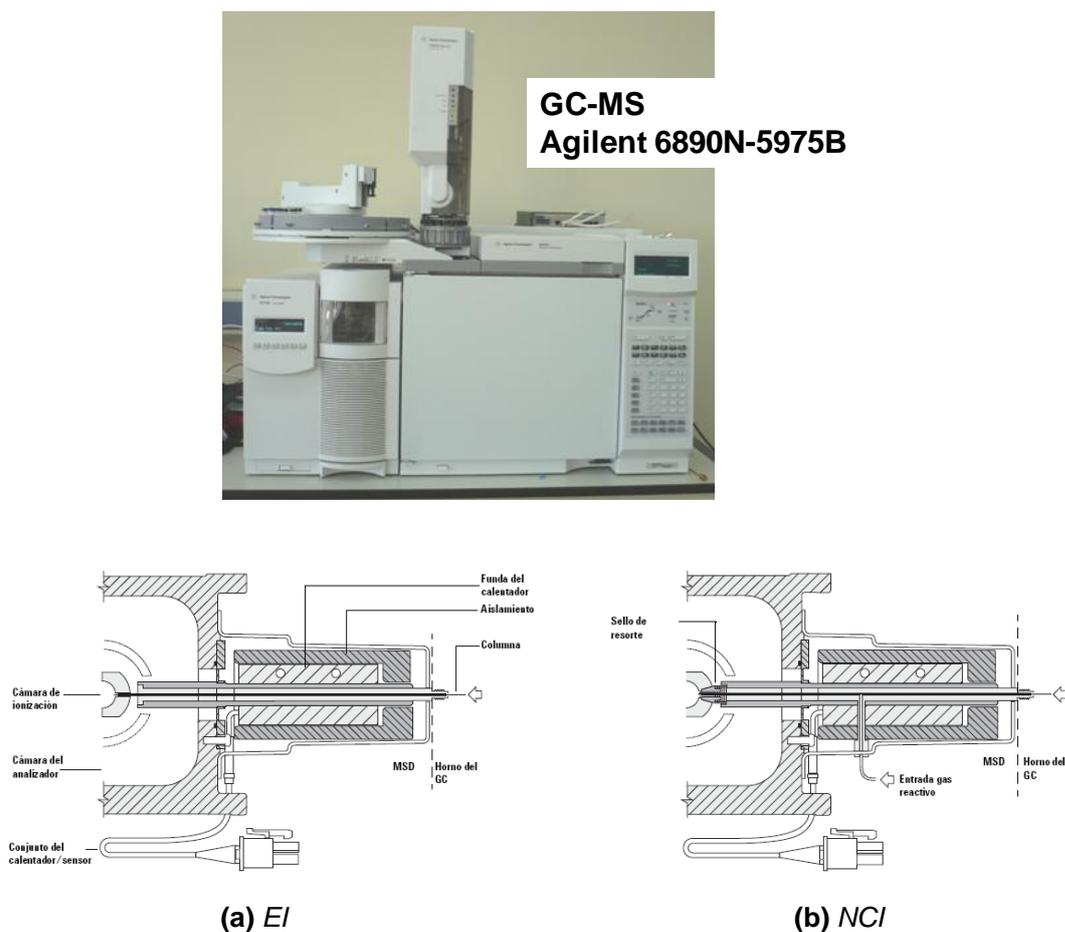


Figura 48. Equipo de GC-MS y esquema de sus dos fuentes de ionización

Sin embargo, según los datos mostrados en la *Tabla 42*, la técnica de (NCI)MS ofrece una exactitud inferior a la obtenida con otras técnicas debido a que, al estar su espectro de masas dominado por la señal del ion Br^- , no permite llevar a cabo la cuantificación mediante IDA utilizando los patrones de PBDEs marcados isotópicamente en ^{13}C disponibles comercialmente. La posibilidad de tener un trazador donde los PBDEs están marcados en ^{81}Br permite la aplicación de la metodología de IDA específico también con esta técnica, por lo que se pueden conseguir resultados comparables a los obtenidos con las otras técnicas.

En el artículo incluido en la sección D.3.3.2 se puede ver que el método de IDA específico elemental desarrollado para la determinación de PBDEs mediante GC-(NCI)MS resulta muy adecuado para el análisis de muestras de agua de río con niveles de concentración del orden de los EQS definidos por la legislación europea, mostrando muy buenas características analíticas a ese nivel de concentración ($0,5 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$) en términos de exactitud, con recuperaciones dentro del rango 80-94%, precisión, con RSDs inferiores a 3% en la mayoría de los casos, y LDs del orden de $0,05\text{-}0,3 \text{ pg} \cdot \text{g}^{-1}$. Los LDs que ofrece este método son comparables o mejores que los que se obtienen con otros métodos descritos en la bibliografía que llevan a cabo la determinación de PBDEs por GC-(NCI)MS y por lo general las precisiones obtenidas mediante este método son bastante superiores a las que aparecen en la bibliografía (ver tablas en la sección A.2.1.2.2).

A la vista de los resultados obtenidos la técnica (NCI)MS resulta muy adecuada para la cuantificación de muy bajos niveles de concentración de PBDEs, aunque desafortunadamente no permite llevar a cabo la identificación de los analitos. También se debe tener en cuenta que la presencia de otros compuestos bromados en la muestra que coeluyan con los analitos y que además sean capaces de generar iones Br^- en la fuente de ionización puede dar lugar a errores en los resultados.⁶ Por tanto, cuando la cuantificación se lleve a cabo mediante esta técnica resulta de gran importancia someter a los extractos de las muestras a etapas de limpieza y fraccionamiento que minimicen la presencia de interferentes en el extracto final, así como la optimización de la separación cromatográfica para lograr una buena separación de los analitos y sus interferentes, utilizando para ello una técnica que permita diferenciar la señal obtenida para ambas sustancias, como puede ser GC-(EI)MS.

D.3.5 Referencias

- ¹ A. Covaci, S. Voorspoels, J. de Boer. **Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples – a review.** *Environ. Int.*, 2003, 29, 735–756.
- ² E. Eljarrat, S. Lacorte, D. Barcelo. **Optimization of congener-specific analysis of 40 polybrominated diphenyl ethers by gas chromatography/mass spectrometry.** *J. Mass Spectrom.*, 2002, 37, 76–84.
- ³ M. Alaei, D.B. Sergeant, M.G. Ikonomou, J.M. Luross. **A gas chromatography/high-resolution mass spectrometry (GC/HRMS) method for determination of polybrominated diphenyl ethers in fish.** *Chemosphere*, 2001, 44 (6), 1489-1495.
- ⁴ B. Gómara, C. García-Ruiz, M. J. González, M. L. Marina. **Fractionation of chlorinated and brominated persistent organic pollutants in several food samples by pyrenyl-silica liquid chromatography prior to GC-MS determination.** *Anal. Chim. Acta*, 2006, 565, 208–213.
- ⁵ A. Covaci, S. Voorspoels, L. Ramos, H. Neels, R. Blust. **Recent developments in the analysis of brominated flame retardants and brominated natural compounds.** *J. Chromatogr. A*, 2007, 1153, 145–171.
- ⁶ P. Korytár, A. Covaci, J. de Boer, A. Gelbind, U. A. Th. Brinkman. **Retention-time database of 126 polybrominated diphenyl ether congeners and two Bromkal technical mixtures on seven capillary gas chromatographic columns.** *J. Chromatogr. A*, 2005, 1065, 239-249.

E.CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

Las principales conclusiones derivadas de la presente Tesis Doctoral pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Se ha desarrollado y validado un método sencillo, rápido y fiable para la determinación de THMs en aguas de consumo humano siguiendo las directrices establecidas en la Norma ISO 10301. El método se basó en la cuantificación de los analitos mediante la metodología de Calibrado Independiente del Compuesto (CIC), utilizando CBrCl_3 como patrón interno e (ICP)MS como detector en GC. El método desarrollado destaca por su sencillez ya que el único tratamiento de muestra que requiere es la adición del patrón interno a la muestra y posterior extracción con un disolvente orgánico. Las características analíticas de este método cumplen todos los requisitos establecidos por la legislación española y europea, lo que unido a su sencillez y rapidez hacen que resulte un método muy apropiado y fácil de implementar para el control de THMs en laboratorios de rutina.
2. Se ha puesto a punto un método de síntesis de PBDEs para la obtención de los congéneres prioritarios marcados en ^{81}Br . Tras la optimización de las condiciones de reacción se identificaron los congéneres obtenidos en el crudo de reacción y se caracterizaron en concentración mediante distintas técnicas de GC-MS (ICP y EI), obteniéndose resultados concordantes. Los compuestos marcados también se caracterizaron en abundancias isotópicas (de Br) mediante GC-(ICP)MS para su posterior aplicación en IDA específico elemental y mediante GC-(EI)MS para determinar los perfiles isotópicos de sus principales fragmentos moleculares necesarios para su aplicación en IDA específico molecular. Finalmente se ensayó con el crudo de la reacción de síntesis la potencial aplicabilidad de los compuestos marcados isotópicamente en ^{81}Br a la determinación de PBDEs en agua ultrapura fortificada con PBDEs.
3. Se ha preparado un trazador que consiste en una mezcla de los PBDEs prioritarios marcados isotópicamente en ^{81}Br para su aplicación a la determinación de PBDEs mediante IDA específico con detección por MS con distintas fuentes capaces de generar iones elementales y moleculares. El trazador fue caracterizado en concentración, abundancias isotópicas y distribución de isotómeros de masa utilizando distintas técnicas de MS (GC-(EI)MS y GC-(NCI)MS), obteniéndose resultados concordantes. También se

llevó a cabo un estudio para evaluar la posible contaminación del trazador con sus congéneres análogos naturales, observándose un nivel de contaminación considerable sólo en el caso de los congéneres prioritarios hexabromados (BDE-153 y BDE-154). Estudios llevados a cabo para la evaluación de la estabilidad del trazador demostraron que su concentración permanece constante y que no se produce intercambio isotópico entre los compuestos naturales y los marcados en una mezcla de ambos, durante un periodo de al menos cuatro meses.

4. Se ha desarrollado y validado una metodología para la determinación de PBDEs en muestras sólidas de origen biológico (pescado) mediante IDA específico en combinación con GC-(EI)MS. La metodología propuesta presentó muy buena exactitud (recuperaciones de 89-116%) y precisión (RSDs < 7%) de los resultados, así como unos LDs apropiados para la determinación de PBDEs a niveles de ultratrazas (0,02-0,9 ng · g⁻¹). Las buenas características analíticas del método junto con su sencillez y rapidez (no requiere la construcción de rectas de calibrado en la etapa de cuantificación de modo que la concentración de los analitos junto con su incertidumbre asociada se puede obtener directamente a través de una única inyección) hacen que resulte muy adecuado para el control de rutina de PBDEs en distintas muestras medioambientales.
5. Se han evaluado las características del sistema GC-(NCI)MS para la medida de relaciones isotópicas de Br (a través de Br⁻) en términos de exactitud y precisión, puesto que esta técnica no se había utilizado nunca para llevar a cabo este tipo de medidas. Las precisiones obtenidas fueron siempre inferiores al 1% (RSD) y la discriminación de masas, único parámetro que afectó a la exactitud de las medidas, fue corregido a través de la medida de la relación isotópica de un patrón con abundancias isotópicas naturales de Br inyectado cada cierto número de muestras. Así, se ha confirmado la idoneidad del sistema GC-(NCI)MS para la medida de relaciones isotópicas de Br.
6. Se ha desarrollado y validado una metodología para la determinación de PBDEs en muestras sólidas de origen biológico (pescado) mediante IDA específico en combinación con GC-(NCI)MS. La metodología propuesta presentó muy buena exactitud (recuperaciones de 80-120%) y precisión (RSD < 4%) de los resultados, así como unos LDs apropiados para la

determinación de PBDEs a niveles de ultratrazas (0,02-0,4 ng·g⁻¹). Los resultados fueron comparables a los obtenidos con la fuente de ionización EI.

7. Se ha desarrollado y validado un método para la determinación de PBDEs prioritarios según la WFD en muestras de agua mediante IDA específico en combinación con GC-(NCI)MS. La metodología propuesta presentó muy buena exactitud (recuperaciones de 78-90%) y precisión (RSD < 4%) de los resultados al nivel de concentración fijado por la WFD en su Directiva EQS, así como unos LQs apropiados para la determinación de PBDEs a muy bajos niveles de concentración (0,05-0,3 pg·g⁻¹). Las buenas características analíticas del método junto con su sencillez y rapidez hacen que resulte muy adecuado para el control de rutina de PBDEs en aguas naturales. Además, el método no requiere la construcción de rectas de calibrado en la etapa de cuantificación de modo que la concentración de los analitos junto con su incertidumbre asociada se puede obtener directamente a través de una única inyección.
8. Por último se ha aplicado la metodología desarrollada a la determinación de los PBDEs prioritarios mediante IDA específico GC-(NCI)MS en aguas del río Nalón recogidas en diferentes puntos a lo largo de su curso, encontrándose, para todas las muestras analizadas, concentraciones por debajo de los valores máximos permitidos por la WFD.

The main conclusions that could be extracted from the present Ph.D. Thesis can be summarized through the following stages:

1. A simple, fast and reliable methodology for the determination of THMs in drinking water according to the International Standard ISO 10301 has been developed and validated. The proposed method was based on the Compound Independent calibration (CIC) quantitation strategy using CBrCl_3 as internal standard and (ICP)MS as GC detector. The main feature of this method is its simplicity, as it only requires the addition of a known amount of internal standard to the sample followed by LLE using an organic solvent and direct injection of the extract into the GC-(ICP)MS system. The analytical characteristics of this method are within the range required by the Spanish and European Legislation ($\text{LD} \leq 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $R = 100 \pm 25\%$ and $\text{RSD} \leq 25\%$) and it could be easily implemented in routine testing laboratories for the monitoring of THMs.
2. A methodology for the synthesis of small amounts of PBDEs has been developed and it has been applied to the synthesis of ^{81}Br -labelled PBDEs. Congeners obtained in the crude reaction mixture were identified and characterized in concentration by different GC-MS systems. Results obtained by GC-(ICP)MS and GC-(EI)MS were in good agreement. The ^{81}Br labelled PBDEs were also characterised in isotope abundance (Br) by GC-(ICP)MS, for its future use in elemental species specific IDA, and by GC-(EI)MS, to determine the mass isotopomer distribution of their main molecular fragments for its application to molecular species specific IDA. Finally the potential applicability of the ^{81}Br -labelled compounds in IDA experiments was evaluated by analyzing ultrapure water samples fortified with natural PBDEs using the crude reaction mixture as spike.
3. A spike mixture consisting of ^{81}Br -labelled priority PBDEs was prepared taking into account the most common congener profiles found in environmental and biological samples to be applied to the determination of PBDEs by species specific IDMS using elemental and molecular ionisation sources. This spike was characterised in concentration, isotope abundance and mass isotopomer distribution. Results obtained using different GC-MS systems (GC-(EI)MS and

GC-(NCI)MS) were in good agreement. Possible contamination of the spike with natural abundance analogue PBDEs was also evaluated by IPD, showing a noticeable contribution from natural contamination only for hexabrominated priority congeners (BDE-153 and BDE-154). The spike was evaluated for its stability in terms of concentration and isotope exchange between bromine atoms from the natural abundance compounds and it turned out to be stable for a period of at least four months.

4. A IDMS methodology for the determination of PBDEs in biological samples (fish tissue) using GC-(EI)MS has been developed and validated. The proposed methodology showed good accuracy (recoveries between 89 and 116%) and precision (RSDs < 7%), as well as suitable LDs (0.02-0.9 ng·g⁻¹) for the determination of PBDEs at ultratrace levels. The good analytical characteristics showed that this method is suitable for the routine monitoring of PBDEs in different environmental samples. Additionally, the method is simple, as the construction of a methodological calibration graph is not required. Every single injection provides the analyte concentrations together with their related uncertainties.
5. The GC(NCI)MS system was evaluated for Br isotope ratio measurements in terms of accuracy and precision (by measuring ⁷⁹Br and ⁸¹Br signals) as this source has not been previously employed in IDMS experiments in combination with ⁸¹Br or any other heteroatom labeling. Obtained precisions were always below 1% (RSD) and mass bias, which was the only parameter affecting accuracy, could be easily corrected by injecting a natural abundance PBDE standard mixture (bracketing approach). Obtained results confirmed the suitability of GC-(NCI)MS for Br isotope ratio measurements.
6. A new methodology for the determination of PBDEs in biological samples (fish tissue) by species specific IDA in combination with GC-(NCI)MS has been developed and validated. The proposed methodology showed good accuracy (recoveries between 80 and 120%) and precision (RSD < 4%) as well as suitable LDs (0.02-0.4 ng·g⁻¹) for the determination of PBDEs at ultratrace levels. Obtained results were in good agreement with those obtained when using EI as ionisation source.

7. A new method for the determination of priority PBDEs according to the WFD by species specific IDA in combination with GC-(NCI)MS has been developed and validated. The proposed methodology showed good accuracy (recoveries between 70 and 90%) and precision ($RSD < 4\%$) at the EQS level for water samples. The low LQs ($0.05\text{-}0.3 \text{ pg g}^{-1}$) obtained with this method make it suitable for the determination of PBDEs at very low concentration levels. The good analytical characteristics showed by this method together with its simplicity make it very suitable for the routine monitoring of PBDEs in natural waters. Furthermore, the proposed method does not require the construction of a methodological calibration graph for quantitation and the analyte concentrations together with their related uncertainties can be obtained straight from a single injection.
8. Finally the proposed methodology has been applied to the determination of priority PBDEs in river water samples collected along the River Nalón (Asturias) by species specific IDA using GC-(NCI)MS. Concentrations found in river water samples were always below the EQS established by the WFD.

**F.SUGERENCIAS PARA TRABAJOS
FUTUROS**

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral y considerando las conclusiones expuestas anteriormente, es posible sugerir algunas líneas de investigación futura, entre las que destacamos las siguientes:

1. Las metodologías desarrolladas para la cuantificación de PBDEs en distintos tipos de muestras de interés medioambiental mediante IDA específico resultan sencillas, rápidas, exactas y precisas. Sin embargo, la etapa de preparación de muestra suele resultar larga y/o laboriosa, especialmente cuando se recurre a métodos considerados de referencia (SE, LLE, SPE). Por ello, la evaluación de las características analíticas obtenidas al utilizar otras metodologías alternativas de preparación de muestra que resulten más rápidas, sean más fáciles de automatizar y/o presenten mayores factores de preconcentración (hot-SE, PLE, SBSE, MAE) podría ser de gran interés. El trazador preparado en este trabajo resultaría ideal para llevar a cabo estos estudios, ya que al tratarse de una mezcla de congéneres análogos a los naturales que no presentan efectos isotópicos, permitiría compensar todas las pérdidas y diluciones que pudiera sufrir la muestra tras haberse logrado una mezcla homogénea con el trazador.
2. Por otro lado, la versatilidad del trazador obtenido permite su aplicación en MS en combinación con todo tipo de fuentes de ionización. Así, el empleo de este trazador permitiría la evaluación y comparación de otras técnicas de MS que pudieran ofrecer características analíticas (exactitud, precisión o LDs) del mismo orden o mejores que las obtenidos con las técnicas empleadas en este trabajo. El (ICP)MS sería un buen ejemplo, ya que, aunque su acoplamiento a la técnica de separación (GC) no resulta tan sencillo como en el caso de las técnicas empleadas en este trabajo, según ciertas publicaciones puede ofrecer mejores LDs que éstas trabajando con analizadores de masas de baja resolución. De este modo sería posible desarrollar nuevos métodos de determinación de PBDEs mediante IDA específico GC-(ICP)MS, que resultaría imposible utilizando los patrones de PBDEs marcados isotópicamente en ^{13}C disponibles comercialmente. También podría resultar de utilidad la evaluación y desarrollo de nuevos métodos de determinación de PBDEs utilizando otras técnicas como GC-(EI)HRMS que, a pesar de ser mucho más cara y complicada que las mencionadas anteriormente, por sus excelentes características analíticas resultaría ideal para el desarrollo de métodos de referencia o en aquellos casos

en los que los LDs requeridos por la legislación no puedan ser alcanzados con técnicas de MS más sencillas. Como alternativa, la utilización de la GC con equipos de triple cuadrupolo podrían disminuir drásticamente los límites de detección cuando se emplea la EI como fuente de ionización.

3. Puesto que los métodos basados en la metodología de IDA específico son métodos absolutos de análisis y proporcionan resultados directamente trazables al Sistema Internacional de Unidades, podrían resultar de gran utilidad para la certificación de materiales de referencia y la realización de ejercicios de intercomparación. Existen algunos materiales de referencia con concentraciones certificadas de PBDEs en distintas matrices como suero, tejidos biológicos, leche, materia particulada o polvo doméstico. Sin embargo, hasta el momento no existe ningún material de referencia que certifique el contenido de estas sustancias en agua, a pesar de que es la WFD la única normativa que establece valores límite para el control de estas sustancias. Por ello podría resultar de gran utilidad la preparación de muestras de aguas superficiales, tanto dulces como saladas, en las que la certificación de los valores de concentración así como los correspondientes estudios de homogeneidad y estabilidad se podrían llevar a cabo mediante IDA específico utilizando el trazador preparado en este trabajo.
4. Por último, cabe destacar que la síntesis de compuestos marcados isotópicamente en heteroátomos, así como su aplicación a la determinación de todo tipo de sustancias que los contengan, mediante IDA esta en continuo crecimiento debido a las importantes ventajas que aporta esta metodología frente a las utilizadas clásicamente. Por ello, siguiendo en esta línea de trabajo, podría resultar interesante la síntesis de otros POPs y/o sustancias incluidas en las listas de contaminantes prioritarios. Los ejemplos más semejantes pueden ser los de PCBs, PBBs, PCDDs/PCDFs y otras sustancias empleadas como insecticidas o pesticidas.

**G. OTRAS PUBLICACIONES
RELACIONADAS**

**G.1 DETERMINACIÓN DE INCERTIDUMBRES EN LA
DISTRIBUCIÓN DE ISOTOPÓMEROS DE MASA DE
MOLÉCULAS**

Artículo científico V. José Ignacio García Alonso, Pablo Rodríguez González,
Adriana González Gago, Ana González Antuña

Determination of the uncertainties in the theoretical mass isotopomer
distribution of molecules

Anal. Chim. Acta, 2010, 664, 68-76



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

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

Determination of the uncertainties in the theoretical mass isotopomer distribution of molecules

J. Ignacio García Alonso*, P. Rodríguez-González, A. González-Gago, A. González-Antuña

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006 Oviedo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 November 2009

Received in revised form 26 January 2010

Accepted 31 January 2010

Available online 6 February 2010

Keywords:

Mass isotopomer distributions

Uncertainty propagation

Mass spectrometry

Labelled compounds

ABSTRACT

A procedure for the determination of the uncertainties in the theoretical mass isotopomer distribution of molecules due to natural variations in the isotope composition of their constituting elements is described here for the first time. For this purpose, a Visual Basic macro for Microsoft Excel was written by adapting the direct stepwise calculation algorithm published by Kubinyi (Anal. Chim. Acta 1991, 247, 107–119, [11] Fig. 1). In our procedure no pruning threshold factors were used to eliminate round up errors for large molecules. Then, the Kragten [13] procedure of uncertainty propagation (Analyst 1994, 119, 2161–2165) was applied taking into account the correlation coefficients between the isotope abundances of the corresponding atoms. For bi-isotopic elements (C, H, N, Cl, Br) the correlation coefficients were given the value of -1 . For tri- and tetra-isotopic elements the correlation coefficients were calculated using the mass dependent fractionation law used in stable isotope geochemistry and values of $+1$ or -1 were obtained depending on the isotope system considered. It was observed that for small organic molecules of natural isotope abundances, such as phenol or polybrominated diphenylethers, the method provided relatively small propagated uncertainties similar in magnitude to those measured experimentally. For ^{13}C -labelled molecules the calculated uncertainties were mainly due to the uncertainties in the isotope enrichment of ^{13}C and were much larger than the experimental uncertainties. For large molecules of natural isotope abundances, such as peptide $\text{C}_{68}\text{H}_{107}\text{N}_{17}\text{O}_{25}$ (NIST 8327 RM), the uncertainties in their mass isotopomer distributions were much larger and their source could be assigned mainly to the uncertainty of the natural isotope composition of carbon. When the size of the molecule was even larger, such as bovine insulin ($\text{C}_{254}\text{H}_{377}\text{N}_{65}\text{O}_{75}\text{S}_6$), Kragten procedure provided a good estimate for the uncertainty when the most probable isotope composition of carbon in mammals was used in the calculations.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The term “uncertainty” is perhaps one of the most employed in modern Analytical Chemistry after the widespread introduction of quality management systems in the analytical laboratory. It has been described in the Vocabulary of basic and general terms in Metrology [1] as “A parameter associated with the result of a measurement that characterizes the dispersion of the values that could reasonably be attributed to the measurand”. Therefore, when an analytical procedure is implemented, a full uncertainty budget should be included as a part of method development and validation. The calculation of uncertainty budgets should take into account all possible sources of uncertainty in the measurements including also “the uncertainties in reference data such as atomic and molecular weights or concentrations of calibrants” [2]. In our laboratory we are working on an alternative procedure for organic isotope dilution

analysis which requires the use of the theoretical mass isotopomer distributions, both for natural abundance and isotopically labelled molecules, in the calculations. According to EURACHEM [2], the uncertainties in the theoretical mass isotopomer distributions of the molecules will need to be computed for the estimation of the uncertainty budgets in this new procedure.

To the best of our knowledge uncertainty estimations for mass isotopomer distributions of molecules have never been described in the literature. However, natural variations in the isotope abundances of the elements will change slightly the isotope composition of a molecule. For example, Hellerstein and Neese [3] indicated that natural variations in the isotope composition of carbon in mammals (typically from 1.08% to 1.11% ^{13}C relative abundance [3]) may have a small influence in Mass Isotopomer Distribution Analysis (MIDA) calculations but the effects were considered negligible in their calculations and natural variations were not taken into account. Additionally, theoretical isotope compositions have been used also in qualitative analysis, e.g. for the confirmation of the chemical formula of organic compounds [4] using automatic recognition algorithms. Nevertheless,

* Corresponding author. Tel.: +34 985 10 34 84; fax: +34 985 10 31 25.
E-mail address: jiga@uniovi.es (J.I. García Alonso).

the uncertainties in the mass isotopomer distribution of candidate molecules have never been implemented in these recognition algorithms.

In many other mass spectrometric applications, such as the optimisation of culture isotope labelling conditions [5], the simulation of isotopomer mass distribution experiments [3] and during the development of isotope dilution analysis procedures for peptides and proteins [6], theoretical mass isotopomer distributions will need to be calculated both at natural abundances and at different isotopic enrichments. If those theoretical isotope patterns are used to obtain quantitative results their uncertainties will need to be calculated.

Current isotope dilution procedures for organic and biological compounds do not require the computation of theoretical isotope distributions. In these procedures the labelled compound is used only as an internal standard added to samples and calibrants so its concentration or its isotope composition does not need to be known precisely. However, in the last few years, alternative calculation procedures for isotope dilution analysis, which involved the measurement of the isotope compositions by Mass Spectrometry, have been developed for elemental analysis [7,8]. The evaluation of such procedures required the calculation of uncertainty budgets in which the uncertainties in the isotope composition of the natural abundance elements must be included [9]. In our laboratory we are trying to extrapolate such methods for the isotope dilution analysis of organic molecules so it was required to calculate both the theoretical mass isotopomer distribution of the natural abundance and labelled molecules and their uncertainties.

For the determination of molecular mass isotopomer distributions several algorithms have been published [10–12] and most computer programs provided by manufacturers of mass spectrometers include a “theoretical isotope peak distribution” calculator. Unfortunately, none of these algorithms or computer programs includes an uncertainty estimate for the calculated mass isotopomer distributions. These mathematical algorithms apply either a polynomial expansion [10], a direct stepwise combination of the isotope composition of the elements [11] or a Fourier transform convolution procedure [12]. None of these algorithms admit differentiation so the direct application of the general equation for uncertainty propagation [2] is not possible. An alternative would be to use calculation procedures which do not require differentiation of the function such as Kragten’s method of uncertainty propagation [13] or Monte Carlo simulations. In our approximation we have selected Kragten method for two main reasons. First, the number of times the mass isotopomer distribution needs to be calculated ($n + 1$ times, where n is the number of isotopes involved) is much lower in comparison with Monte Carlo simulations, where between 100 and 1000 simulations need to be performed depending on the number of parameters involved. Second, Kragten’s procedure is easily implemented using spreadsheet software and the validity of the results can be tested using positive and negative values of the estimated uncertainties [13].

Meija and Mester [14] reflected recently on the effect of isotope abundance correlation on the uncertainties of elemental atomic weights. The isotopic abundances of the elements are always correlated because the sum of all abundances is 1. The correlation coefficients for bi-isotopic elements such as carbon or hydrogen are always $r = -1$ [14]. However, for tri-, tetra- or poly-isotopic elements the correlation coefficients will need to be calculated. In this work, the correlation coefficients between the isotope abundances of a given poly-isotopic element were calculated applying the mass dependent fractionation law [15] used in stable isotope geochemistry. The final procedure is applied here for the determination of the isotope composition and its uncertainty for small organic molecules, metallic chelates, peptides and proteins of current interest in our laboratory.

2. Procedures

2.1. Calculation algorithm for the isotope peak distribution

A Visual Basic programme was written as a macro for Excel by adapting the calculation algorithm described by Kubinyi [11]. To avoid round up errors no pruning thresholds were used and the whole mass isotopomer distribution was calculated. Additionally, and in contrast to Kubinyi’s procedure, no normalization of the intermediate mass isotopomer distributions was done during the calculations so the sum of the whole isotopomer pattern was always 1. Data on the natural isotopic composition of the elements [16] and the exact mass of the isotopes [17] were introduced in the Excel spreadsheet and were read from the Visual Basic programme. Finally, the resulting isotopic composition for the first 20 consecutive masses was returned to the spreadsheet as output. The macro was tested by calculating the isotopic composition of bovine insulin ($C_{254}H_{377}N_{65}O_{75}S_6$) using exactly the same elemental isotope abundances than those employed by Kubinyi. The results were identical to those reported in his paper [11] indicating that no computing errors were present in the programme. The actual version of the macro programme is prepared for 18 different types of atoms (natural abundance H, B, C, N, O, F, Si, P, S, Cl, Fe, Br, Se, I and isotopically enriched forms of C, Cl, Br and Fe) and the distribution is calculated for a maximum of 2000 consecutive masses. However, the number of atom types and the number of masses can be incremented easily.

2.2. Kragten procedure for the calculation of mass isotopomer distribution uncertainties

For uncertainty propagation Kragten’s method uses the following linear approximation:

$$\frac{\partial y}{\partial x_i} \approx \frac{y(x_i + u(x_i)) - y(x_i)}{u(x_i)} = \frac{u(y, x_i)}{u(x_i)} \quad (1)$$

assuming that higher order terms in the MacLaurin series are negligible. The uncertainty in the function y due to the uncertainty in the parameter x_i , $u(y, x_i)$, is estimated as the difference in the values of the function y when the value of x_i is substituted by $x_i + u(x_i)$. It is claimed [2,13] that, when the relative uncertainties of the parameters are small, this procedure provides acceptable accuracy for practical purposes.

For the determination of the mass isotopomer distribution of a given molecule, the parameters x_i will be the isotope abundances of the constituting atoms and their uncertainties $u(x_i)$ their tabulated natural variability. We have taken these data from the last compilation of the representative isotope composition of the elements and their uncertainties due to natural variations by the IUPAC [16]. It is clear that for certain elements, such as carbon, the isotope composition and uncertainties tabulated in the IUPAC table may not be adequate for animal or plant derived compounds where ^{13}C isotope enrichment compared to inorganic carbon is well documented. In this paper we have decided to use the IUPAC values for all elements but the database could be easily modified to suit particular circumstances (e.g. carbon isotope abundances for materials of biological origin such as bovine insulin).

The Kragten [13] procedure requires the isotope composition of the target molecule to be calculated $n + 1$ times being n the number of isotopes present in the molecule. For example, for phenol C_6H_6O , the number of isotopes is $n = 7$ (1H , 2H , ^{12}C , ^{13}C , ^{16}O , ^{17}O and ^{18}O). The isotope composition is first calculated using the nominal isotope abundances given in the database and then it is calculated another n times by adding (or subtracting) sequentially the standard uncertainty in the isotope composition of every isotope. To illustrate how Kragten’s procedure works, Table 1 shows the input

Table 1

Input data and intermediate results for the implementation of the Kragten procedure for the determination of the mass isotopomer distribution of phenol and its uncertainty.

A. Input data									
Isotope	Abundance (nominal)	Standard uncertainty	¹ H	² H	¹² C	¹³ C	¹⁶ O	¹⁷ O	¹⁸ O
¹ H	0.999885	0.000035	0.999920	0.999885	0.999885	0.999885	0.999885	0.999885	0.999885
² H	0.000115	0.000035	0.000115	0.000150	0.000115	0.000115	0.000115	0.000115	0.000115
¹² C	0.9893	0.0004	0.9893	0.9893	0.9897	0.9893	0.9893	0.9893	0.9893
¹³ C	0.0107	0.0004	0.0107	0.0107	0.0107	0.0111	0.0107	0.0107	0.0107
¹⁶ O	0.99757	0.00008	0.99757	0.99757	0.99757	0.99757	0.99765	0.99757	0.99757
¹⁷ O	0.000380	0.000005	0.000380	0.000380	0.000380	0.000380	0.000380	0.000385	0.000380
¹⁸ O	0.00205	0.00007	0.00205	0.00205	0.00205	0.00205	0.00205	0.00205	0.00212
B. Calculated isotopomer distributions									
Nominal mass	Mass isotopomer distribution	¹ H	² H	¹² C	¹³ C	¹⁶ O	¹⁷ O	¹⁸ O	
94	0.934570	0.934766	0.934570	0.936839	0.934570	0.934645	0.934570	0.934570	0.934570
95	0.061649	0.061662	0.061846	0.061774	0.063916	0.061654	0.061654	0.061649	0.061649
96	0.003626	0.003627	0.003639	0.003633	0.003753	0.003626	0.003626	0.003691	0.003691
97	0.000151	0.000151	0.000152	0.000152	0.000159	0.000151	0.000151	0.000156	0.000156
C. Calculated standard uncertainties									
Nominal mass	$u(y, ^1\text{H})$	$u(y, ^2\text{H})$	$u(y, ^{12}\text{C})$	$u(y, ^{13}\text{C})$	$u(y, ^{16}\text{O})$	$u(y, ^{17}\text{O})$	$u(y, ^{18}\text{O})$		
94	0.000196	0.000000	0.002270	0.000000	0.000075	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000
95	0.000013	0.000196	0.000125	0.002267	0.000005	0.000005	0.000005	0.000000	0.000000
96	0.000001	0.000013	0.000007	0.000127	0.000000	0.000000	0.000000	0.000066	0.000066
97	0.000000	0.000001	0.000000	0.000008	0.000000	0.000000	0.000000	0.000004	0.000004

data and the intermediate results obtained for phenol. Please note that the mass isotopomer distributions will be always given as absolute abundances with a constant sum of 1. As can be observed in part A of the table, the isotope peak distribution at masses 94, 95, 96, 97 and 98 needs to be calculated 8 times by modifying sequentially the input isotope composition of each isotope as indicated in Table 1A. The results obtained for the isotopomer distributions calculated are shown in Table 1B. Finally, the standard uncertainties $u(y, x_i)$ for each isotopomer i (Table 1C) are calculated by subtracting the result obtained at the modified abundances from those calculated using the nominal elemental isotope abundances as shown also in Table 1. For example, the standard uncertainty for ¹³C at nominal mass 95 of phenol, $u(y, ^{13}\text{C})$, is 0.002267 (Table 1C).

Then, the combined standard uncertainties for each element j in the molecule were calculated using the equation:

$$u(y(\text{Element}_j)) = \sqrt{\sum_{i=1,n} (u(y, x_i))^2 + \sum_{i,k=1,n} (r_{ik} u(y, x_i) u(y, x_k))} \quad (2)$$

where the covariances are substituted by the correlation coefficients and standard uncertainties [2]. The final total combined uncertainty was then calculated by the square sum of all the uncertainties due to each element using:

$$u(y) = \sqrt{\sum_{j=1,m} (u(y(\text{Element}_j)))^2} \quad (3)$$

where m is the number of elements in the molecule. This calculation procedure allows to compute the contribution of each element in the molecule to the total uncertainties for each nominal mass (in %).

For validation purposes, the procedure was applied always twice by adding and subtracting the standard uncertainties in two separate calculations as recommended in the original paper by Kragten [13]. The final abundance uncertainties are indicated in this paper as $u(A)(+)$ and $u(A)(-)$ with two significant figures.

3. Results and discussion

3.1. Calculation of the correlation coefficients for different elements

As already indicated by Meija and Mester [14], the isotope abundances of di-isotopic elements are perfectly anti-correlated. The correlation coefficient for di-isotopic elements is always $r = -1$. That means that, for carbon for example, Eq. (2) will be:

$$u(y(\text{Carbon})) = \sqrt{(u(y, ^{12}\text{C}))^2 + (u(y, ^{13}\text{C}))^2 + 2(-1)u(y, ^{12}\text{C})u(y, ^{13}\text{C})} \quad (4)$$

Similar equations will be given for hydrogen, boron, nitrogen, chlorine or bromine. However, for poly-isotopic elements, the calculation of the correlation factors is not trivial. Meija and Mester [14] proposed a method for the calculation of the correlation factors for tri-isotopic elements based on the stated isotope abundance uncertainties. However, their method could not be extended to any poly-isotopic element. In this paper we propose an alternative method which could be applied to any poly-isotopic element. This alternative method is based on the application of the mass dependent fractionation law [15], used in stable isotope geochemistry, to predict the correlation factors between the different isotopes of an element.

For an element in two possible isotope states A and B, the fractionation factor α_{A-B} between both states for two given isotopes a and b is given by the following equation [15]:

$$\alpha_{A-B}^{a/b} = \frac{R_A^{a/b}}{R_B^{a/b}} \quad (5)$$

where $R_A^{a/b}$ and $R_B^{a/b}$ are the isotope ratios a/b in the states A and B, respectively. The mass dependent fractionation law calculates the fractionation factor for any other pair of isotopes of the same

element, for example isotopes c and b , using:

$$\alpha_{A-B}^{c/b} = \left(\alpha_{A-B}^{a/b} \right)^z \quad (6)$$

where $z = \frac{m_a}{m_c} \left(\frac{m_c - m_b}{m_a - m_b} \right)$ and m_a , m_b and m_c the exact masses of the corresponding isotopes [15].

For the calculation of the correlation coefficients we have assumed that state A is the nominal IUPAC isotope composition and state B is an altered composition but within the stated natural variation range [16]. Then, if we express Eqs. (5) and (6) in terms of isotope abundances, A , instead of isotope ratios (e.g. $R^{a/b} = A^a/A^b$) we end up with:

$$\left(\frac{A_A^c}{A_A^b} \right) \left(\frac{A_B^a}{A_B^b} \right)^z = \left(\frac{A_B^c}{A_B^b} \right) \left(\frac{A_A^a}{A_A^b} \right)^z \quad (7)$$

If we group all terms in state A (IUPAC values) as a single constant K_A we obtain:

$$\left(\frac{A_B^a}{A_B^b} \right)^z \left(\frac{A_B^c}{A_B^b} \right)^{1-z} = K_A \cdot A_B^c \quad (8)$$

Eq. (8) relates the isotope abundance of a given isotope c of a poly-isotopic element with the abundances of two other isotopes of the element, a and b , assuming a mass dependent fractionation of the isotopes a , b and c .

3.1.1. Tri-isotopic elements

For tri-isotopic elements, such as oxygen, magnesium or silicon, the relationship between the abundances of all isotopes will be given by Eq. (8) if the mass dependent fractionation law is obeyed. If we consider that the sum of all abundances is 1 we can give tentative values to one of the abundances (e.g. ^{30}Si) to calculate the other two. Eq. (8) will provide always two solutions for the isotope abundances but only one of the solutions provided positive isotope abundances within the stated elemental uncertainties. For example, Fig. 1 shows the calculated isotope abundances for ^{28}Si and ^{29}Si giving tentative values for ^{30}Si within the stated natural variation range (e.g. ^{30}Si abundances varied from 0.03081 to 0.03103) and assuming the mass dependent fractionation law. As can be observed, the variation in the isotope abundances follows a straight line of positive (^{29}Si vs. ^{30}Si) or negative (^{28}Si vs. ^{30}Si) slope. The calculated correlation coefficients were $r_{30/29} = 1$, $r_{30/28} = -1$ and $r_{29/28} = -1$. For the case of oxygen the correlation coefficients found were $r_{18/17} = 1$, $r_{18/16} = -1$ and $r_{17/16} = -1$. For magnesium the correlation coefficients were: $r_{26/25} = 1$, $r_{26/24} = -1$ and $r_{25/24} = -1$. As can be observed, all these correlation coefficients are values of 1 or -1 indicating a linear trend of positive or negative slope. For all three-isotope systems tested, the slope is negative when comparing a minor and the major isotope and it is positive when the two

minor isotopes are compared. In all cases the major isotope is the lower in mass (^{16}O , ^{24}Mg or ^{28}Si) and the minor isotopes are 1 or 2 masses higher. These results may be relevant for elemental isotopic studies as, for example, the isotope ratio $^{30}\text{Si}/^{28}\text{Si}$ (negative correlation) will change in nature relatively more than the ratio $^{30}\text{Si}/^{29}\text{Si}$ (positive correlation).

3.1.2. Tetra-isotopic elements

For a tetra-isotopic element, such as sulfur, iron or chromium, the system of equations is more complex. First, we can establish two independent equations similar to Eq. (8) using three of the four isotopes of the element. For example, for iron we can establish two equations using isotopes 54, 56 and 58 or 56, 57 and 58. At the end we obtain two non-linear equations with two unknowns which would provide 4 different solutions. We observed that only one of the solutions gave meaningful results with positive isotope abundances within the stated natural variability. As for the three-isotope systems, there was a linear variation between the isotope abundances with values of the six possible correlation coefficients of 1 or -1 . The actual values found for the six correlation coefficients for iron were: $r_{54/56} = -1$, $R_{54/57} = -1$, $R_{54/58} = -1$, $R_{56/57} = 1$, $R_{56/58} = 1$ and $R_{57/58} = 1$. These calculations were performed also for sulfur and chromium. The correlation coefficients obtained for sulfur were: $r_{33/32} = -1$, $R_{33/34} = 1$, $R_{33/36} = 1$, $R_{32/34} = -1$, $R_{32/36} = -1$ and $R_{34/36} = 1$ while for chromium: $r_{50/52} = 1$, $r_{50/53} = -1$, $r_{50/54} = -1$, $r_{52/53} = -1$, $r_{52/54} = -1$ and $r_{53/54} = 1$. The correlation coefficients between the two major isotopes for each element are always negative (^{54}Fe – ^{56}Fe , ^{53}Cr – ^{52}Cr and ^{34}S – ^{32}S) while for the minor isotopes the sign of the correlation coefficient depends on the corresponding isotope abundances and on their relative mass. No calculations were performed for other higher poly-isotopic elements. Once the correlation factors were calculated, the application of Eq. (2) for each element is straightforward.

3.2. Calculation of the uncertainties in the mass isotopomer distributions for selected molecules

3.2.1. Example 1: the mass isotopomer distribution of phenol

First, phenol was selected as a proof of concept to test the validity of this approach as this molecule has been used in our laboratory to develop a new procedure for isotope dilution analysis of organic molecules based on minimal labelling and Isotope Pattern Deconvolution [18]. The procedure was applied for natural abundance, singly $^{13}\text{C}_1$ -labelled and fully $^{13}\text{C}_6$ -labelled phenol. The nominal enrichment of the labelled compounds was given as 99% ^{13}C by the manufacturer [18]. Table 2A shows the final results obtained for natural abundance phenol. These results were obtained from the data shown in Table 1. Relative abundances higher than 0.0001

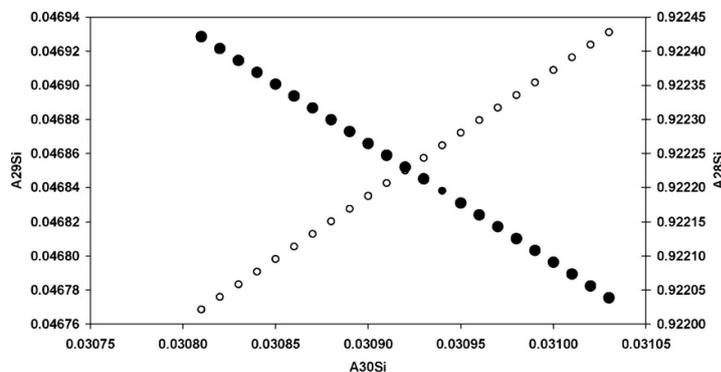


Fig. 1. Three-isotope abundance plot for silicon calculated using the mass dependent fractionation law. (○) ^{29}Si and (●) ^{28}Si .

Table 2

The isotope composition of natural abundance and labelled phenols and the distribution of their uncertainty sources between the different elements (in %).

A. Natural abundance phenol								
Nominal mass	Mass isotopomer distribution	$u(A)(+)$	$u(A)(-)$	$u(A)$ experimental ($n = 3$) [18]	Carbon	Hydrogen	Oxygen	
94	0.9346	0.0023	0.0023	0.00092	99	1	0	
95	0.0616	0.0022	0.0022	0.00066	99	1	0	
96	0.00363	0.00014	0.00013	0.000072	76	1	23	
97	0.000151	0.000008	0.000008	0.000050	73	1	26	
B. $^{13}\text{C}_1$ -phenol								
Nominal mass	Mass isotopomer distribution	$u(A)(+)$	$u(A)(-)$	$u(A)$ experimental ($n = 3$) [18]	Carbon	Hydrogen	Oxygen	^{13}C
94	0.0094	0.0055	0.0055	0.00015	0	0	0	100
95	0.9358	0.0055	0.0055	0.00029	12	0	0	88
96	0.0516	0.0018	0.0018	0.00014	97	1	0	2
97	0.00307	0.00011	0.00010	0.000095	57	1	39	3
98	0.000118	0.000006	0.000006	0.000026	66	1	32	1
C. $^{13}\text{C}_6$ -phenol								
Nominal mass	Mass isotopomer distribution	$u(A)(+)$	$u(A)(-)$	$u(A)$ experimental ($n = 3$) [18]	Hydrogen	Oxygen	^{13}C	
98	0.0014	0.0021	0.0011	0.00023	0	0	0	100
99	0.057	0.031	0.031	0.00079	0	0	0	100
100	0.939	0.033	0.032	0.00036	0	0	0	100
101	0.00112	0.00020	0.00020	0.00012	98	0	0	2
102	0.001929	0.000095	0.000094	0.000093	0	48	52	

are given in the tables. The validity of the Kragten procedure was evaluated by calculating the propagated uncertainties both after adding or subtracting the standard uncertainties for each isotope. The uncertainty values calculated by adding the standard uncertainties are indicated as $u(A)(+)$ and those calculated by subtracting the standard uncertainties as $u(A)(-)$. The uncertainty results were identical to the 5th decimal place for all masses. For example, the uncertainty for mass 94 changed only from 0.002279 to 0.002275 validating the uncertainty calculation procedure for this compound. Table 2 also shows the distribution of the uncertainty between the different elements after calculating the relative contribution from Eq. (3). It was observed that for the natural abundance compound, more than 99% of the uncertainty at masses 94 and 95 was due to the uncertainty in the isotope composition of carbon.

For the calculation of the isotope distribution of the labelled phenols and its uncertainty, we needed to establish the uncertainties for the isotope composition of ^{13}C in both labelled compounds. The isotope enrichment of the labelled compounds was indicated as 99% by the manufacturer [18] so the uncertainty was calculated assuming a rectangular distribution [2] and dividing the maximum range ($\pm 1\%$) by the square root of 3. The results obtained for the singly ($^{13}\text{C}_1$) and fully labelled ($^{13}\text{C}_6$) phenol are summarized in Table 2B and C respectively. For the singly labelled phenol the uncertainty values were almost the same by both calculation procedures (adding or subtracting the standard uncertainties). However, for the fully labelled phenol these uncertainties differ after the 3rd decimal figure and mainly for low abundance masses. For the main peak at mass 95 of $^{13}\text{C}_1$ -phenol the abundance and its uncertainty would be given as 0.9358 ± 0.0055 while for the main peak of $^{13}\text{C}_6$ -phenol at mass 100 it would be 0.939 ± 0.033 with only three significant figures. As can be observed, the uncertainties increased with the number of ^{13}C atoms in the molecule due to the high uncertainty in the ^{13}C isotope enrichment. Table 2 also includes the sources of uncertainty for all masses in the isotope distribution in % for each element. For the labelled compounds, the uncertainty was dominated by the ^{13}C isotope enrichment uncertainty. When the isotope composition of the labelled compounds is used in the isotope dilution calculations [18], it is clear that certificates of ^{13}C isotope enrichment with more significant figures will be needed to reduce this uncertainty source.

Table 2 also shows the experimental uncertainties [18] obtained for the measurement of the mass isotopomer distribution of natural abundance phenol and both ^{13}C -labelled compounds by GC-MS. Experimental details can be found elsewhere [18]. As can be observed the experimental uncertainties (standard deviations from $n = 3$ independent experiments) are smaller than the theoretical uncertainties particularly for the ^{13}C -labelled phenols. So, the isotope enrichment for these labelled compounds could be better certified by the experimental measurement of its mass isotopomer distribution.

3.2.2. Example 2: the mass isotopomer distribution of brominated diphenyl ethers

We have synthesized in our laboratory a group of brominated diphenyl ethers (PBDEs) labelled with ^{81}Br for their use as standards for the determination of PBDEs in environmental samples [19] using Isotope Pattern Deconvolution procedures. For our purposes, the mass isotopomer distribution and its uncertainty both for the natural abundance and labelled compounds had to be determined. In this case, the bromine isotope composition of the labelled PBDEs could be measured in our laboratory [19]. By using GC-ICP-MS coupling the isotope composition of bromine was determined to be 0.9953 for ^{81}Br and 0.0047 for ^{79}Br with standard uncertainties of 0.0001 for both isotopes. These uncertainties are lower than those tabulated for the natural variation expected for bromine [16], which are of 0.00035 for both bromine isotopes. The results obtained for the tetrabrominated diphenyl ether BDE-47 ($\text{C}_{12}\text{H}_6\text{OBr}_4$) are summarized in Table 3 for natural abundance BDE-47 (A), for the $^{81}\text{Br}_4$ -labelled analogue (B) and for the commercially available $^{13}\text{C}_{12}$ -labelled compound (C). As can be observed, the uncertainty values $u(A)(+)$ and $u(A)(-)$ are very similar in all cases validating the Kragten approximation. For the most abundant peaks in the mass spectrum of both natural and labelled compounds the uncertainty source is dominated by the carbon isotope composition with some contribution by the natural or enriched bromine isotope composition depending on the selected nominal mass. For the ^{13}C -labelled compound the only source of uncertainty was the isotope composition of carbon which was given as 99% enriched.

For the most abundant peak in the isotope distribution of natural $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{OBr}_4$, nominal mass 486, the abundance would be indicated as 0.3307 ± 0.0015 while for the most abundant peak of the $^{81}\text{Br}_4$ -

Table 3
Isotope composition of tetrabrominated diphenyl ether ($C_{12}H_6OBr_4$) and its uncertainty sources (%).

A. Natural abundance								
Nominal Mass	Abundance	$u(A)(+)$	$u(A)(-)$	$u(A)$ experimental ($n = 5$) [19]	Carbon	Hydrogen	Oxygen	Bromine
482	0.05785	0.00032	0.00032	0.00062	76	0	0	24
483	0.00757	0.00025	0.00025	0.00023	99	0	0	1
484	0.2257	0.0011	0.0011	0.00098	92	0	0	8
485	0.02949	0.00097	0.00097	0.00018	100	0	0	0
486	0.3307	0.0015	0.0015	0.00058	100	0	0	0
487	0.0431	0.0014	0.0014	0.00036	100	0	0	0
488	0.21626	0.00091	0.00091	0.0012	89	0	0	11
489	0.02806	0.00092	0.00092	0.00026	100	0	0	0
490	0.05392	0.00020	0.00020	0.00077	44	0	0	56
491	0.00690	0.00023	0.00023	0.00028	99	0	0	1
B. Isotope labelled ($^{81}Br_4$)								
Nominal Mass	Abundance	$u(A)(+)$	$u(A)(-)$	$u(A)$ experimental ($n = 5$) [19]	Carbon	Hydrogen	Oxygen	^{81}Br
486	0.000115	0.000005	0.000005	0.00045	1	0	0	99
487	0.000015	0.000001	0.000001	0.00081	37	0	0	63
488	0.01624	0.00035	0.00035	0.0012	5	0	0	95
489	0.002125	0.000082	0.000083	0.0038	71	0	0	29
490	0.8600	0.0042	0.0042	0.0055	99	0	0	1
491	0.1125	0.0037	0.0037	0.0021	100	0	0	0
C. Isotope labelled ($^{13}C_{12}$)								
Nominal mass	Abundance	$u(A)(+)$	$u(A)(-)$	$u(A)$ experimental ($n = 5$) [19]	Hydrogen	Oxygen	Bromine	^{13}C
493	0.0071	0.0038	0.0037	0.00044	0	0	0	100
494	0.0599	0.0020	0.0028	0.00071	0	0	1	99
495	0.028	0.014	0.014	0.00052	0	0	0	100
496	0.229	0.013	0.014	0.00090	0	0	0	100
497	0.041	0.021	0.021	0.00092	0	0	0	100
498	0.333	0.022	0.021	0.0015	0	0	0	100
499	0.026	0.013	0.013	0.00029	0	0	0	100
500	0.216	0.015	0.014	0.00089	0	0	0	100
501	0.0066	0.0032	0.0033	0.00022	0	0	0	100
502	0.0527	0.0038	0.0036	0.00031	0	0	0	100

labelled compound, nominal mass 490, the abundance would be 0.8600 ± 0.0042 . For the $^{13}C_{12}$ -labelled compound the abundance of the most abundant peak, nominal mass 498, was 0.333 ± 0.022 . As can be seen in Table 3, the theoretical uncertainties increased drastically for the $^{13}C_{12}$ -labelled compound in comparison with the natural abundance and the $^{81}Br_4$ -labelled.

The experimental uncertainties (standard deviations of $n = 5$ measurements [19]) are also given in Table 3. As can be observed the experimental uncertainties are similar in magnitude to the theoretical ones for the natural abundance compound and the $^{81}Br_4$ -labelled. However, for the $^{13}C_{12}$ -labelled compound the theoretical uncertainties are up to 20 times higher than the experimental ones. This means, as in the case of $^{13}C_6$ -labelled phenol, that better certificate of the isotope enrichment could be obtained by the experimental measurement of the mass isotopomer distribution.

3.2.3. Example 3: the mass isotopomer distribution of Fe_3 citrate $_3$

The study of the molecule which transports iron in Fe-deficient plants [20] required the comparison of the experimental isotope profile with different theoretical profiles calculated both using natural abundance iron and isotopically enriched iron. When enriched ^{54}Fe was used for iron re-supply in Fe-deficient plants, the transporting molecule resulted to be a trinuclear iron-citrate of formula $(Fe_3C_{18}H_{15}O_{22})^{2-}$ as measured by LC-MS with electrospray ionisation [20]. The comparison of the theoretical and experimental isotope abundances both using natural abundance iron and ^{54}Fe -enriched iron confirmed the structure of the molecule [20]. Fig. 2 shows the theoretical mass isotopomer distribution and its uncertainty for natural abundance $(Fe_3C_{18}H_{15}O_{22})^{2-}$. The $u(A)(+)$ and $u(A)(-)$ values were identical for this molecule to the 4th decimal place. The sources of uncertainty distributed for each element (in

%) for several selected masses are also indicated in Fig. 2. As can be observed, the uncertainty is dominated also here by the uncertainty in the isotope composition of carbon and, for some masses, with a small contribution from iron or oxygen. In summary, the calculation of the uncertainties of the theoretical mass spectra will improve the metrological quality of current formula assignment methods based on matching scores [4].

3.2.4. Example 4: the mass isotopomer distribution of peptide NIST 8327 RM

The preparation of isotopically labelled peptides for their use in the isotope dilution analysis of proteins after trypsin digestion is an area of growing interest. For this purpose, labelled peptides with one or several ^{13}C will need to be prepared and, perhaps, certified in isotope composition and concentration depending on the isotope dilution procedure applied. Anyway, both for the calibration of isotope dilution procedures, using the labelled peptide as internal standard, or for the certification of the concentration of labelled peptides using reverse isotope dilution analysis a certified natural abundance peptide standard will be required. Ideally, natural abundance peptide standards should be certified reference materials. Peptide NIST 8327 RM ($C_{68}H_{107}N_{17}O_{25}$) is one of the few peptides which can be obtained nowadays certified in purity on a weight basis. The proposed procedure has been applied to this peptide and the final results are summarized in Table 4. In this table we have reduced the number of significant digits to 4 because of the increased relative uncertainty. The main peak in the isotope distribution of this peptide occurs at nominal mass 1561 (exact mass 1561.76) with an abundance of 0.420 ± 0.012 . The Kragten procedure shows slightly different values for the $u(A)(+)$ and the $u(A)(-)$ uncertainties. The main source of uncertainty in this molecule is

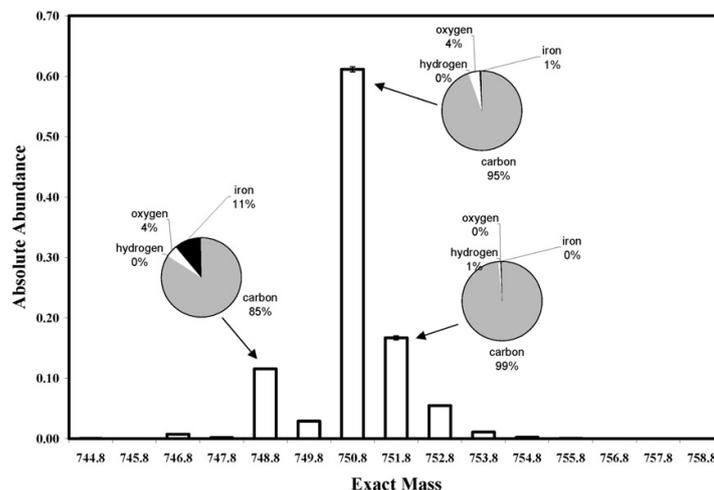


Fig. 2. The isotope composition of the iron-transporting molecule in plants ($\text{Fe}_3\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{O}_{22}$)²⁻ and its associated uncertainty (error bars). The circular graphs represent the uncertainty sources (in %) distributed for the different elements at each selected mass.

again the isotope composition of carbon as can be extracted from Table 4. If this peptide was of natural origin (animal or plant material) its isotope composition and uncertainties would be different from the data shown in Table 4. First, biological carbon has higher ^{13}C isotope enrichment (between 1.08% and 1.11% for mammals [3]) in comparison to the IUPAC value (1.07% enrichment) and, second, the variation range is smaller. Obviously, for biological applications the isotope composition of carbon and its uncertainty used in the database would need to be changed.

Another important use of peptides in modern quantitative proteomics is in the study of the differential expression of proteins between control and altered physiological states. Several relative quantitation procedures using isotopically coded tags have been published in the literature [21]. One of those procedures, reductive dimethylation [22], involves the derivatisation of NH_2 groups in the peptide with H_2CO (formaldehyde). The result of the reaction is the introduction of two methyl groups in the N-terminal amino acid and in the ϵ -amino units of lysine residues [22]. For differential expression proteomics control states would be derivatised with natural abundance formaldehyde while altered states would be derivatised with isotopically labelled formaldehyde and then both samples would be mixed before LC–MS(MS) analysis [22]. The use of D_2CO was recommended in the literature [22] but other labelling alternatives exist. We have calculated the isotope composition of peptide NIST 8327, whose amino acid sequence is DAEPDILELATGYR, after derivatisation with natural abundance and ^{13}C -labelled formaldehyde enriched at 99% ^{13}C . As no lysine is present in the peptide the derivatisation will introduce only two methyl groups in the molecule and the mass shift between the nat-

ural abundance and the isotopically labelled peptide would be of only two mass units. Traditionally [22], this mass shift is considered insufficient for relative protein quantitation because of overlap in the mass spectra, but it serves its purpose for this study. Fig. 3 shows the calculated mass isotopomer distribution both for the natural abundance and the isotopically labelled derivatised peptide. The error bars on the relative abundances are the calculated propagated uncertainties. As can be observed, the base peaks at exact masses of 1589.8 and 1591.8 for the natural abundance and isotopically labelled peptide respectively show quite large propagated uncertainties while the peaks at $M+1$ mass units for both compounds show relatively low uncertainties with only a little lower isotope abundances. For example, for the natural abundance peptide the relative uncertainty reduced from 2.9% at mass M (base peak) to 0.6% at mass $M+1$ while for the labelled peptide the reduction is from 3.1% to 1.4%. That means that lower uncertainty in the differential expression proteomic studies would be provided if the ratio of labelled to unlabelled peptides was performed at the $M+1$ ions instead of at the M ion. This fact would have never been anticipated if no uncertainty calculations were performed.

3.2.5. Example 5: the mass isotopomer distribution of bovine insulin

Bovine insulin ($\text{C}_{254}\text{H}_{377}\text{N}_{65}\text{O}_{75}\text{S}_6$) has been till now the molecule of choice for the evaluation of isotope distribution calculation programs [4,11]. However, no uncertainty values have ever been given for this protein. Thus, the validity of Kragten procedure for larger molecules will be tested here. For bovine insulin we have taken into account that the most probable isotopic composi-

Table 4

Isotope composition of natural abundance peptide NIST 8327 RM ($\text{C}_{68}\text{H}_{107}\text{N}_{17}\text{O}_{25}$) and its uncertainty sources (%).

Exact mass	Abundance	$u(A)(+)$	$u(A)(-)$	Carbon	Hydrogen	Oxygen	Nitrogen
1561.8	0.420	0.012	0.012	97	2	1	0
1562.8	0.3444	0.0022	0.0024	90	2	8	0
1563.8	0.1610	0.0052	0.0050	97	2	1	0
1564.8	0.0548	0.0030	0.0028	95	2	3	0
1565.8	0.0150	0.0012	0.0010	93	2	5	0
1566.8	0.0035	0.0003	0.0003	91	2	7	0
1567.8	0.0007	0.0001	0.0001	89	2	9	0
1568.8	0.0001	0.0000	0.0000	87	2	11	0

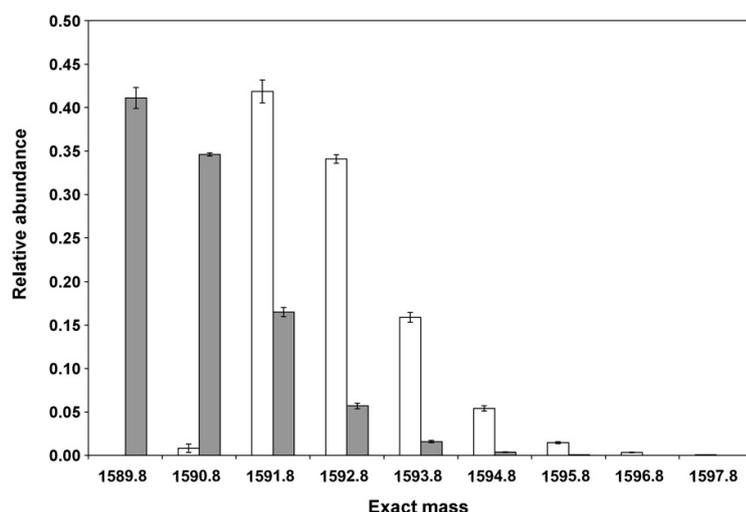


Fig. 3. The calculated mass isotopomer distribution and their uncertainties for the dimethylated peptide DAEPDILELATGYR (NIST 8327) both using natural abundance (grey bars) or 99% enriched ¹³C (white bars) formaldehyde as reagent.

Table 5

The isotope composition of bovine insulin (C₂₅₄H₃₇₇N₆₅O₇₅S₆) and its uncertainty sources (%).

Exact mass	Abundance	$u(A)(+)$	$u(A)(-)$	Relative uncertainty (%)	Carbon	Hydrogen	Oxygen	Nitrogen	Sulfur
5729.6	0.0286	0.0009	0.0009	3.2	67	18	4	4	7
5730.6	0.0902	0.0021	0.0020	2.3	60	16	7	4	13
5731.6	0.1539	0.0023	0.0022	1.5	52	14	11	4	19
5732.6	0.1863	0.0013	0.0013	0.7	37	11	20	3	30
5733.6	0.1780	0.0003	0.0003	0.2	45	11	30	3	11
5734.6	0.1421	0.0012	0.0011	0.8	63	17	3	4	13
5735.6	0.0981	0.0015	0.0015	1.6	54	15	7	4	21
5736.6	0.0600	0.0014	0.0014	2.3	48	13	10	3	25
5737.6	0.0331	0.0010	0.0010	3.1	45	12	12	3	28
5738.6	0.0166	0.0006	0.0006	3.9	41	12	13	3	31
5739.6	0.0077	0.0004	0.0003	4.7	39	11	14	3	33
5740.6	0.0033	0.0002	0.0002	5.5	36	10	15	3	35
5741.6	0.0013	0.0001	0.0001	6.4	34	10	16	2	37
5742.6	0.0005	0.0000	0.0000	7.3	32	9	17	2	38
5743.6	0.0002	0.0000	0.0000	8.2	31	9	18	2	40

tion of carbon in mammals is 1.09% ¹³C with a range of variation of $\pm 0.02\%$ [3]. This isotope composition of carbon is different from that given in the IUPAC tables (1.07% with an expanded uncertainty of $\pm 0.08\%$). The results obtained in the calculations are given in Table 5 to four significant figures. The first observation is that the isotope peak distribution is quite broad with a maximum absolute abundance of 0.1863 at nominal mass 5730 ($M+3$ ion, exact mass 5732.6). The calculated uncertainties $u(A)(+)$ and $u(A)(-)$ differ now in the 4th or 5th decimal place indicating that Kragten procedure provides also a good estimation of the uncertainty for this molecule (because of the reduced uncertainty in the carbon isotope composition). The method predicts also decreasing relative uncertainties for increasing exact masses from 5729.6 (3.2% relative uncertainty) to 5733.6 (0.2% relative uncertainty). Then, the relative uncertainties increased again as the abundance decreased for higher masses. The fact that the relative uncertainties in the theoretical mass isotopomer distributions are not the same for all masses could help in the selection of the best masses for automatic chemical formula assignment procedures or for isotope dilution calculations. From Table 5 it can be also observed that the calculated uncertainties are mainly due to the natural isotope variability of carbon with an increasing contribution from sulfur particularly for the high masses.

4. Conclusions

The uncertainties in the theoretical mass isotopomer distribution of molecules have been traditionally ignored in the previously published computation algorithms [10–12]. From a purely metrological point of view, and for future error propagation calculations, this subject needed to be addressed. We have developed a method capable of predicting the uncertainties in the low resolution mass isotopomer distribution of small and medium sized molecules. For larger molecules, such as bovine insulin, the method provides adequate results when the most probable isotope composition of carbon in mammals is taken into account.

For most of the studied molecules the main source of uncertainty is the natural variability in the carbon isotope composition. It is well known that the isotope composition of carbon can be measured very precisely by Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS) for different compounds by coupling GC or LC to the IRMS using a combustion or oxidation interface. Then, better estimates of the isotope distribution of molecules could be accomplished.

There are two other aspects of the proposed procedure which may need to be addressed in future studies. First, interelemental correlations have not been taken into account but could be also present (a given isotope enrichment on ¹⁵N could be correlated

with the enrichment on ^{13}C or ^{18}O). The second aspect is that the isotope composition of carbon in a molecule may not be identical for all carbon atoms. Those two aspects would need to be addressed in future studies for a better evaluation of the mass isotopomer distribution uncertainties.

However, in its present form, the procedure developed here may find different applications. For example, in the formula pre-screening of tentative molecules using isotope peak abundances [4], where the uncertainties in the theoretical isotope abundances can be used to provide weighing factors in the algorithms. In addition, the full understanding and validation of quantitative methodologies based on the measurement of isotopomer abundances in organic isotope dilution analysis requires the calculation of full uncertainty budgets [18]. The uncertainties in the isotope composition of the molecules cannot be ignored from those budgets as they may be important contributors to the total uncertainty on the final analyte concentration.

References

- [1] International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, ISO, Geneva, 1993.
- [2] Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements, EURACHEM/CITAC Guide, 2000.
- [3] M.K. Hellerstein, R.A. Neese, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 276 (1999) 1146.
- [4] S.G. Roussis, R. Proulx, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1470.
- [5] T. Murakami, A. Sasaki, E. Fukushi, J. Kawabata, M. Hashimoto, T. Okuno, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15 (2005) 2591.
- [6] S. Pan, R. Aebbersold, R. Chen, J. Rush, D.R. Goodlett, M.W. McIntosh, J. Zhang, T.A. Brentnall, *J. Proteome Res.* 8 (2009) 787.
- [7] J.A. Rodríguez-Castrillón, M. Moldovan, J. Ruiz Encinar, J.I. García Alonso, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 23 (2008) 18.
- [8] J.A. Rodríguez-Castrillón, M. Moldovan, J.I. García, J.J. Alonso, M.L. Lucena, L. García-Tomé, Hernández-Apaolaza, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 579.
- [9] J.A. Rodríguez-Castrillón, M. Moldovan, J.I. García Alonso, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 351.
- [10] J. Yergey, D. Heller, G. Hansen, R.J. Cotter, C. Fenselau, *Anal. Chem.* 55 (1983) 353.
- [11] H. Kubinyi, *Anal. Chim. Acta* 247 (1991) 107.
- [12] A.L. Rockwood, S.L. Van Orden, R.D. Smith, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2699.
- [13] J. Kragten, *Analyst* 119 (1994) 2161.
- [14] J. Meija, Z. Mester, *Metrologia* 45 (2008) 459.
- [15] C.M. Johnson, B.L. Beard, G. Albarède, *Geochemistry of Non-Traditional Stable Isotopes*, The Mineral Society of America, Washington, 2004.
- [16] J.K. Böhlke, J.R. de Laeter, P. De Bièvre, H. Hidaka, H.S. Peiser, K.J.R. Rosman, P.D.P. Taylor, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 34 (2005) 57.
- [17] G. Audi, A.H. Wapstra, *Nucl. Phys. A* 595 (1995) 409.
- [18] A. Gonzalez-Antuña, G. Centineo, P. Rodríguez-Gonzalez, J.I. García Alonso, *Analyst*, doi:10.1039/B924432H.
- [19] A. Gonzalez-Gago, M. Ferrero, J.M. Marchante-Gayon, J.I. García Alonso, Synthesis and characterization of ^{81}Br -labelled polybrominated diphenyl ethers, in: Presented at the European Winter Conference on Plasma Spectrometry, Graz, Austria, February 2009.
- [20] R. Rellán-Álvarez, J. Giner-Martínez-Sierra, J. Orduna, I. Orera, J.Á. Rodríguez-Castrillón, J.I. García Alonso, J. Abadía, A. Álvarez-Fernández, *Plant Cell Physiol.* 51 (2010) 91.
- [21] A. Prange, D. Pröfrock, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 23 (2008) 432.
- [22] J.-L. Hsu, S.-Y. Huang, N.-H. Chow, S.-H. Chen, *Anal. Chem.* 75 (2003) 6843.