



Universidad de Oviedo

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA

Programa de Doctorado Análisis Químico, Bioquímico y Estructural
Avanzado (Mención de Calidad)

**DESARROLLO DE METODOLOGÍAS DE CUANTIFICACIÓN DE
COMPUESTOS ORGÁNICOS BASADAS EN DILUCIÓN ISOTÓPICA
EN LÍNEA DE CARBONO-13 Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

TESIS DOCTORAL

SERGIO CUETO DÍAZ

OVIEDO, 2013

A. INTRODUCCIÓN	1
A.1 Análisis cuantitativo	1
A.1.1 Calibración de métodos instrumentales.....	1
A.1.2. Comparación con estándares	2
A.1.3. Método del estándar externo	2
A.1.4. Método de adiciones estándar	3
A.1.5. Método del estándar interno	3
A.2 Análisis por dilución isotópica	4
A.2.1. Los isótopos y el origen de la espectrometría de masas.....	4
A.2.2. Abundancias isotópicas naturales.....	7
A.2.3. Análisis por dilución isotópica: Definición y breve historia.....	8
A.2.4 Fundamento y consideraciones generales	9
A.2.4.1 Ventajas de la dilución isotópica	10
A.2.4.2 Fuentes de error en el análisis por dilución isotópica.....	10
A.2.5. Estrategias de calibración en IDMS	11
A.2.5.1. Método gráfico	11
A.2.5.2 Dilución isotópica simple	12
A.2.5.3 Calibración por dilución isotópica doble.....	13
A.2.5.4 Método del ajuste exacto	14
A.2.5.5 Deconvolución de perfiles isotópicos.....	15
A.2.6 Análisis por dilución isotópica de moléculas orgánicas.....	16
A.2.6.1 Instrumentación	17
A.2.6.2 Aplicaciones	17
A.2.7 Análisis por dilución isotópica elemental (inorgánica).....	18
A.2.7.1 Instrumentación	19
A.2.7.2 Aplicaciones en dilución isotópica elemental	19
A.3 Dilución isotópica en línea	21
A.3.1 Cuantificación independiente del compuesto.....	21
A.3.2 El concepto de la dilución isotópica en línea	22
A.3.3 Ecuaciones de la dilución isotópica en línea.....	24
A.3.4 Cuantificación por dilución isotópica en línea: cromatograma de flujo molar .	25
A.3.4.1 Dilución isotópica en línea con patrón interno	26

A.3.5 Instrumentación para dilución isotópica en línea	28
A.3.6 Ventajas y desventajas de la dilución isotópica en línea	29
A.3.7 Aplicaciones de la dilución isotópica en línea.....	30
A.3.7.1 Dilución isotópica en línea en análisis de especiación y proteómica cuantitativa.....	30
A.4 Evaluación de la pureza química de compuestos orgánicos	35
A.4.1 Terminología.....	35
A.4.2 Métodos de análisis de pureza química de sustancias puras.....	38
A.4.2.1 Tipos de métodos de análisis de pureza	38
A.4.2.1.a Determinación directa de la cantidad de componente principal (n_{cp})..39	
1.-Gravimetría.....	39
2.-Volumetría.....	39
3.-Resonancia magnética nuclear cuantitativa (<i>q</i> -NMR) con patrón interno	40
4.-Análisis por dilución isotópica	41
5.-Análisis elemental	41
6.-Otras técnicas con potencial para la determinación directa de la cantidad de componente principal	42
A.4.2.1.b Determinación directa de la fracción en masa (w_{cp}) o moles (x_{cp}) del componente principal	44
1.-Cálculo del porcentaje en área por cromatografía de gases (GC)	44
2.-Cálculo del porcentaje en área mediante cromatografía líquida (LC)	45
3.-Cálculo del porcentaje en área mediante resonancia magnética nuclear (RMN).....	45
-A.4.1.2.c Métodos para la determinación de la fracción molar de impurezas (Σx_i)	45
-Métodos térmicos	46
-Análisis por solubilidad de fases	47
A.5 Determinación de la pureza en masa de estándares de péptidos	47
A.5.1 Cuantificación absoluta de proteínas por espectrometría de masas.....	47
A.5.2 Análisis de aminoácidos (AAA).....	49
A.5.3 Otros métodos para la determinación de la pureza de péptidos.....	50
Referencias bibliográficas.....	53
B.OBJETIVOS	59

C. EXPERIMENTAL	65
C.1 Desarrollo de un sistema de cromatografía de gases-combustión-masas y dilución isotópica post-columna de carbono	67
C.1.1 Interfase de combustión.....	68
C.1.2 Sistema de adición post-columna de un flujo de $^{13}\text{CO}_2$ disuelto en helio	69
C.1.3 Válvula de 6 vías	70
C2. Desarrollo de un sistema para la determinación de carbono inorgánico total en aguas mediante dilución isotópica en línea de ^{13}C	71
C.3 Sistema de cuantificación de sustancias orgánicas solubles en agua mediante dilución isotópica post-columna de carbono	73
D. RESULTADOS	77
D.1. Desarrollo y evaluación de un sistema de cuantificación genérico de compuestos volátiles para cromatografía de gases basado en dilución isotópica post-columna de ^{13}C	79
D.1.1 Desarrollo inicial y prueba de concepto.....	79
D.1.1.1 Artículo científico I: Angew. Chem. Int. Ed.2009, 48, 2561-2564	79
D.1.2 Desarrollo detallado del sistema GC-combustión-(EI)MS y aplicación a la evaluación cuantitativa de la micro-extracción en fase sólida en espacio de cabeza..	89
D.1.2.1 Artículo científico II: Anal. Chem. 2010, 82, 6862-6869	89
D.2. Desarrollo y optimización de un sistema genérico de cuantificación de compuestos orgánicos solubles en agua mediante FIA/LC-oxidación-MS y dilución isotópica en línea de ^{13}C	105
D.2.1 Optimización y validación de un sistema de análisis por inyección en flujo para la cuantificación de CO_2 en disolución por dilución isotópica en línea de ^{13}C	105
D.2.1.1 Artículo Científico III: Anal. Bional. Chem. 2012, 402, 91-97	105
D.2.2 Desarrollo y optimización de un sistema FIA/LC-oxidación-MS y dilución isotópica en línea de ^{13}C para la cuantificación de compuestos orgánicos solubles en agua	115
D.2.2.1 Artículo científico IV: Anal. Chem. 2013, 85, 1873-1879.....	115
D.3. Aplicación del método LC-oxidación-MS y dilución isotópica en línea de ^{13}C a la certificación de la pureza de sustancias orgánicas puras	125
D.3.1 Validación de la metodología para la certificación de la pureza de sustancias orgánicas polares de baja complejidad estructural: participación en el estudio piloto p117c organizado por el BIPM	125
D.3.1.1 Resumen de resultados del ejercicio de intercomparación p117c	125

D.3.2 Validación de la metodología para la certificación de la pureza de estándares sintéticos de péptidos.....	145
D.3.2.1 Artículo científico V	145
<i>E. INFORME SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES PRESENTADAS</i>	169
<i>F. DISCUSIÓN INTEGRADORA.....</i>	171
<i>G. CONCLUSIONES</i>	201

A. INTRODUCCIÓN

A.1 ANÁLISIS CUANTITATIVO

El análisis cuantitativo es aquel en el que se determina o estima la cantidad o concentración de un analito y se expresa como valor numérico en unidades adecuadas.¹ Requiere de la identificación previa (análisis cualitativo) de dicho analito.

Cuando se analiza una muestra mediante una técnica instrumental determinada, se genera una señal física o química cuya magnitud es proporcional a la cantidad de la especie a determinar que hay en la muestra. Esta respuesta puede ser proporcional bien a la cantidad absoluta en la muestra (número de moles) o bien a la cantidad relativa (concentración), en función de la técnica de análisis empleada. En general, la relación entre la señal analítica medida (S_A), y la concentración del analito (C_A), puede expresarse del siguiente modo:

$$S_A = kC_A + S_e \quad [1]$$

En donde k es la constante de proporcionalidad entre señal y concentración, y representa la sensibilidad del método analítico, y S_e es la contribución a S_A , debida fundamentalmente a los reactivos utilizados (blancos). Por tanto, para obtener un valor exacto para la concentración del analito, es necesario corregir los errores sistemáticos que afectan a S_A , k y S_e . Esto se lleva a cabo habitualmente mediante la realización de calibraciones con estándares y la determinación de los blancos de reactivos.

A.1.1 Calibración de métodos instrumentales

La calibración instrumental de un método, en ocasiones denominada estandarización, se define como el proceso por el cual se determina la relación entre la respuesta instrumental a la propiedad medida y la concentración del analito en la muestra, es decir se obtiene el valor k de la ecuación anterior. En principio, sería posible determinar el valor de k de cualquier método de forma teórica, considerando los procesos físicos o químicos que tienen lugar y que generan la señal analítica. Sin embargo, en la práctica, debido bien a la inexistencia de un modelo teórico suficientemente desarrollado para los procesos físicos, o bien al comportamiento no ideal de los sistemas químicos, no es posible determinar el valor de k de una forma fiable mediante cálculos teóricos. Por tanto, a excepción de los métodos gravimétricos y algunos métodos coulombimétricos, es necesario determinar dicha relación de forma experimental mediante la medida de

estándares específicos para cada sustancia a determinar y que contienen una cantidad de analito conocida de antemano.

A.1.2. Comparación con estándares

Es el procedimiento más básico de calibración. Existen dos tipos principales, la comparación directa y la titulación o valoración. En el primer caso se compara una propiedad del analito (o del producto resultante de una reacción con el analito), frente a estándares de manera que dicha propiedad concuerde lo máximo posible con la del estándar. Un ejemplo sería una determinación colorimétrica en la cual el color generado por una reacción con el analito, se compara con distintas diluciones de estándares. La concentración de la muestra se corresponderá con aquella dilución de estándar que tenga la misma intensidad de coloración. Del mismo modo la valoración puede considerarse como un tipo de comparación química dado que la cantidad del estándar valorante necesario para alcanzar la equivalencia química, se relaciona directamente con la cantidad de especie de interés en la muestra.

A.1.3. Método del estándar externo

Es el método de calibración instrumental más utilizado. En este caso los patrones y la muestra se preparan por separado. Este método de calibración se usa para calibrar un instrumento o procedimiento de medida siempre y cuando no existan interferencias de matriz. La forma más simple de aplicación consiste en utilizar un solo punto. Para ello se prepara y se mide un único patrón de concentración conocida, de modo que el valor k se determina mediante la expresión:

$$k = \frac{C_p}{S_p} \quad [2]$$

Siendo C_p y S_p la concentración y la señal para el patrón respectivamente. Sin embargo, emplear un único punto de calibración no es del todo recomendable por diversas causas: por un lado, todos los errores experimentales son arrastrados hasta el valor final de k ; además cualquier incertidumbre asociada a k repercute directamente en la incertidumbre de la concentración del analito. Por otra parte la calibración se realiza para un único nivel de concentración, por tanto si se desea cuantificar analitos a concentraciones distintas de las del patrón empleado, debe de asumirse que el valor de k es constante para todo el intervalo de concentraciones, lo cual no tiene porqué ser

cierto.² Aun así la calibración empleando un solo punto se utiliza habitualmente en laboratorios de rutina (clínicos o farmacéuticos), en donde las concentraciones esperadas de analito se mueven en intervalos pequeños y conocidos. En la mayoría de los casos, sin embargo, se calibra empleando múltiples puntos, midiendo varios patrones de concentración creciente (al menos tres), de manera que se obtiene una representación gráfica de la señal de los estándares frente a la concentración. Si la gráfica obtenida es lineal, lo cual es habitual, se obtiene la ecuación de la recta mediante mínimos cuadrados y la pendiente obtenida proporciona el valor de k . La principal desventaja de este método de calibración viene de asumir que la respuesta instrumental para un determinado analito va a ser la misma independientemente de si el analito está presente en la muestra, y por tanto acompañado de otras muchas sustancias, o en una disolución estándar. Sin embargo existen diversos factores que pueden provocar que esta suposición no se cumpla tales como interferencias de matriz o distintas condiciones experimentales entre la medida de los blancos y los patrones y la medida de la muestra, que conducen a que el resultado obtenido sea erróneo.

A.1.4. Método de adiciones estándar

Esta forma de calibración es especialmente útil en el caso de muestras complejas en las que hayan altas probabilidades de producirse efectos de matriz. Consiste en realizar sobre la propia muestra, normalmente dividida en alícuotas, una o varias adiciones de una disolución estándar. Como el volumen añadido de disolución estándar es muy pequeño en comparación con el volumen total de muestra, se considera que la matriz de la muestra original y de las adicionadas es idéntica. A continuación se procede a la medida tanto de la alícuota sin adicionar como de las distintas alícuotas adicionadas y se representa la señal medida frente a la cantidad añadida. Si la relación entre ambas magnitudes es lineal, la extrapolación de la recta a $x=0$ proporcionará la cantidad de analito en la muestra.

A.1.5. Método del estándar interno

Un estándar interno es un compuesto distinto del analito que se añade en concentración constante tanto a muestras como a patrones, incluyendo blancos. Se emplea para corregir posibles errores tanto sistemáticos como aleatorios durante las etapas de preparación de muestra y/o medida tales como las fluctuaciones en la señal instrumental o la variación en la concentración del analito en muestras o patrones

debido a evaporación del disolvente, por poner algunos ejemplos. Si se emplea un estándar interno adecuado la relación entre las señales medidas para analito y patrón será independiente de los posibles errores que puedan producirse durante el proceso de análisis. Igualmente los efectos de matriz pueden atenuarse siempre que las dos señales estén afectadas del mismo modo por los componentes de la matriz. La mayor dificultad en la aplicación de este método, es la elección de un patrón interno adecuado dado que éste debe de cumplir una serie de condiciones para poder obtener resultados fiables. El patrón interno lógicamente no debe de estar presente en la matriz de la muestra y debe comportarse de manera similar al analito durante las distintas etapas del análisis, es decir sus propiedades físico-químicas han de ser análogas. Al mismo tiempo la señal de ambos debe ser suficientemente diferente para que puedan ser distinguidos en el detector y cuantificados por separado.

En este caso, para construir la recta de calibrado, se representa la relación de señales para analito y estándar interno frente a la relación de concentraciones.

$$\frac{S_A}{S_{EI}} = \frac{k_A * C_A}{k_{EI} * C_{EI}} = k * \frac{C_A}{C_{EI}} \quad [3]$$

A.2 ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA

A.2.1. Los isótopos y el origen de la espectrometría de masas

El descubrimiento de la existencia de los isótopos de los elementos químicos está íntimamente ligado al desarrollo de la espectrometría de masas. El término “isótopo” fue acuñado por primera vez por Frederick Soddy en 1913, para referirse a aquellos elementos que procedían de procesos de decaimiento radiactivos y que poseían más de una masa atómica pero cuyas propiedades químicas eran idénticas (por ejemplo el Pb). No obstante, en ese momento se consideró como un fenómeno exclusivo de los elementos radiactivos, siendo necesarios numerosos estudios y el desarrollo de la espectrometría de masas para demostrar que los elementos ligeros y estables también poseían isótopos. Como punto de partida de la espectrometría de masas podrían tomarse los experimentos llevados a cabo por J. J. Thomson y W. Wien a finales del siglo XIX.

Thomson³ realizó estudios sobre los rayos catódicos llegando a las siguientes conclusiones:

- las partículas negativas y los rayos catódicos se desplazaban en la misma dirección
- los rayos eran desviados tanto por campos tanto eléctricos como magnéticos
- las partículas portadoras de carga eran las mismas independientemente del gas existente en el tubo de descarga
- el camino libre promedio dependía sólo de la densidad del gas

Por su parte desde 1898 W. Wien⁴ realizaba estudios sobre otro tipo de partículas generadas en tubos de descarga, los denominados “Canal Rays” o rayos anódicos, descubiertos por Goldstein en 1896. Wien descubrió que los rayos anódicos no atravesaban ningún tipo de materia sólida sino solamente láminas agujereadas a través de las cuales se formaban rayos fluorescentes. Demostró que estaban cargados positivamente y que al igual que los rayos catódicos, se desviaban en presencia de campos eléctricos o magnéticos. Las diferentes coloraciones de la fluorescencia



Figura 1. Tubo de descarga de rayos anódicos

obtenidas usando distintos gases puros, parecían indicar que estas partículas diferían en función del gas utilizado.

Entre 1907 y 1910, Thomson desarrolló y perfeccionó un espectrógrafo de masas de tipo parabólico dotado con una pantalla fluorescente, que le permitió obtener un mayor poder de resolución de los rayos anódicos del que obtuvo Wien en sus experimentos, observando las líneas del hidrógeno y del helio. En una versión posterior,⁵ y en colaboración con F. Aston, utilizó una película fotográfica como detector, publicando el estudio de distintos gases, entre ellos el Neon, para el cual obtuvo dos líneas, una intensa a masa 20 y una más débil correspondiente a una masa de 22 uma, además también encontró líneas a m/e 10 y 11 correspondientes a las especies con dos cargas. En ese momento Thomson concluyó que el Neon era en realidad una mezcla de dos gases.

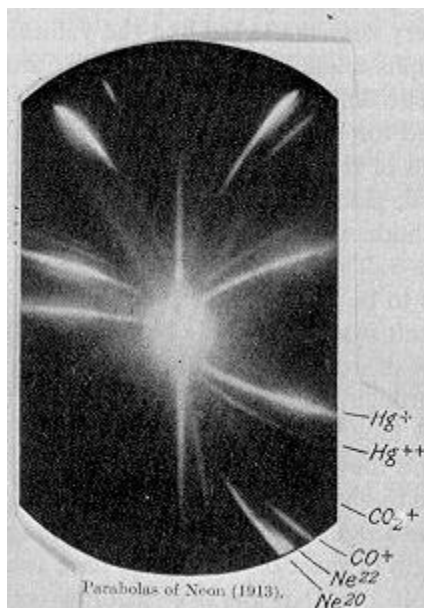


Figura 2. Espectro de masas del Neon obtenido por Thomson y Aston

En 1912 Thomson construyó el que podría denominarse el primer espectrómetro de masas.⁶ Los rayos anódicos eran desviados en una primera etapa por un campo eléctrico constante y posteriormente por un campo magnético que iba aumentando en pequeños incrementos. Tras una rendija situó una copa de Faraday de manera que fue capaz de medir la corriente de descarga de las partículas que atravesaban dicha rendija. Los experimentos posteriores de mayor relevancia fueron realizados por F.W.Aston, el cual trató de resolver el porqué de la línea a m/z 22 en el espectro de masas del Neon. Tras intentar infructuosamente la separación de las dos partículas por métodos físicos, procedió a un análisis espectrométrico, para el cual diseñó un espectrógrafo de masas que le permitió llegar a un valor de resolución relativamente alto de en torno a 100, con lo cual pudo obtener valores de masa bastante exactos. Su principal cometido fue demostrar porqué el peso atómico del Neon, que había sido determinado por Watson en 1910 obteniendo un valor de 20,200 uma, quebrantaba la conocida como “regla del número entero”. Esta teoría había sido formulada por William Prout en 1815, y postulaba que las masas atómicas de los elementos eran múltiplos de la masa del hidrógeno. Mediante medidas de masa exacta tanto de Ne^+ como de Ne^{2+} , Aston obtuvo los valores para 20.00 y 22.00 en una proporción de 9:1, valores que generaban un promedio que coincidía perfectamente con el dato de 20,200 uma obtenido por Watson. Además Aston observó una línea muy débil (<1%) a m/e 21, lo que sugería la existencia de una tercera partícula o isótopo de Neon con una abundancia muy pequeña, lo cual

encaja perfectamente con las abundancias hoy conocidas (^{20}Ne 90,5%, ^{22}Ne 9,2%, ^{21}Ne 0,3%).⁷ Del mismo modo Aston determinó la composición isotópica de distintos elementos tales como Ar, Kr, Hg o Cl.

En Marzo de 1921 tuvo lugar una reunión entre los científicos más importantes del campo, Soddy, Aston, Thomson, Merton y Lindemann. Finalmente concluyeron que existían suficientes evidencias de que los elementos ligeros podían estar compuestos por más de un isótopo. Este descubrimiento explicaba la desviación que sufrían algunos elementos con respecto a la regla del número entero, la cual resultaba aproximadamente cierta para los isótopos de los elementos. Ya en 1925 se había hallado la composición isotópica de unos 50 elementos químicos y en 1948 el número aumentó hasta 83, gracias principalmente a los trabajos de Aston y Dempster.

A.2.2. Abundancias isotópicas naturales

A medida que evolucionaban los espectrómetros de masas, permitiendo medidas mucho más exactas y precisas, se descubrió que además de aquellos elementos que provienen de series de desintegración radiactivas como Pb o Sr (elementos radiogénicos), las abundancias naturales de los isótopos de algunos elementos, aunque prácticamente constantes en la naturaleza, sufrían pequeñas variaciones (del orden de tantos por mil) debido a distintos procesos físicos, químicos o biológicos, que favorecen el enriquecimiento de un isótopo sobre otro (fraccionamiento). Los elementos más estudiados hasta el momento han sido los ligeros (C,H,N,O y S) ya que hasta no hace mucho se creía que la variación en las abundancias isotópicas de los elementos de transición eran despreciables debido a su mayor masa (fraccionamiento dependiente de la masa prácticamente inexistente).⁸ La mejora en la instrumentación, en técnicas de purificación y en el conocimiento de los procesos que provocan el fraccionamiento isotópico han posibilitado el estudio y el desarrollo de nuevas aplicaciones basadas en la medida de variaciones isotópicas naturales también de elementos pesados (Fe, Tl, Hg, Cd, etc...). No obstante cuando se emplea la medida de relaciones isotópicas con objeto de obtener información cuantitativa (dilución isotópica), se consideran las abundancias de los elementos constantes, dado que en general la incertidumbre de la composición isotópica de un elemento debido a variaciones naturales es muy pequeña en comparación con otras fuentes de incertidumbre en análisis por dilución isotópica y por tanto puede despreciarse.

A.2.3. Análisis por dilución isotópica: Definición y breve historia

El análisis por dilución isotópica se basa en utilizar como patrones internos sustancias análogas al analito pero con una abundancia isotópica alterada, denominadas comúnmente trazadores o “spikes”.⁹ La cantidad de analito en una muestra se determina mediante espectrometría de masas, a partir del cambio en las abundancias isotópicas del elemento presente en dicha muestra inducido por la adición del spike. El trazador, por tanto, será el propio elemento enriquecido en un isótopo minoritario en el caso del análisis elemental inorgánico, o una molécula análoga al analito pero marcada isotópicamente en alguno de los átomos que la conforman (D, ¹³C, ¹⁵N, generalmente) en el caso de análisis de compuestos orgánicos.

El concepto de dilución isotópica en análisis químico fue desarrollado y aplicado inicialmente en 1913 por Hevesy y Paneth en la determinación de la solubilidad del sulfuro de plomo en aguas, para lo cual emplearon isótopos radiactivos de plomo como trazadores.¹⁰ Con el progresivo desarrollo de la espectrometría de masas, ambas técnicas se combinaron dando lugar al análisis por dilución isotópica tal y como lo conocemos hoy en día (IDMS del inglés Isotope Dilution Mass Spectrometry) permitiendo el uso de trazadores no radiactivos. Los primeros experimentos empleando trazadores estables enriquecidos datan de 1939-1940 en donde se empleaban patrones de aminoácidos o ácidos grasos enriquecidos en ¹⁵N o en deuterio, respectivamente.^{11,12} El análisis por dilución isotópica sufrió un gran impulso durante los años 50 en el campo del análisis elemental, y se aplicó principalmente a la determinación de elementos procedentes de procesos de decaimiento radiactivo, utilizando mayoritariamente ionización térmica acoplada a espectrometría de masas (TIMS) como técnica espectrométrica, dado que permite obtener muy buenas exactitudes y precisiones en la medida de relaciones isotópicas.^{9,13} Durante los años 70 y 80, debido al desarrollo de nuevos espectrómetros de masas (en especial los GC-MS) y a la mayor disponibilidad de compuestos marcados, la aplicación del análisis por dilución isotópica al análisis de compuestos orgánicos resurgió con fuerza mayoritariamente en el campo del análisis clínico y toxicológico dado que permitía obtener resultados con buena exactitud y precisión en matrices biológicas complejas.¹⁴ Ya durante la década de los 90 se popularizó el empleo del plasma de acoplamiento inductivo acoplado a espectrometría de masas (ICP-MS) en el análisis elemental por dilución isotópica debido a que presentaba importantes ventajas frente a TIMS, principalmente un tratamiento de muestra mucho más sencillo y

la posibilidad de acoplamiento con técnicas cromatográficas, además de conseguirse niveles de precisión prácticamente equivalentes.¹⁵ Hoy en día, el análisis por dilución isotópica se emplea incluso en análisis de rutina y, dada la alta calidad de los resultados que proporciona y a su condición de método primario de análisis, tal y como se explicará posteriormente, se emplea frecuentemente como método de referencia y en la certificación de materiales de referencia.^{16,17}

A.2.4 Fundamento y consideraciones generales

La dilución isotópica se basa en un concepto relativamente sencillo. Una cantidad conocida de trazador enriquecido isotópicamente se adiciona a la muestra y posteriormente se determina la relación existente entre ambas sustancias mediante espectrometría de masas. El procedimiento a grandes rasgos sería como sigue:

- 1.- Caracterización del trazador, mediante dilución isotópica inversa, utilizando un patrón de abundancias naturales certificado. Si se dispone de un trazador enriquecido certificado esta etapa no es necesaria.
- 2.- Adición de una cantidad exacta y conocida del trazador a una cantidad de muestra determinada con exactitud.
- 3.- Equilibrio de la muestra durante un tiempo adecuado (equilibrio isotópico). Esta es una etapa clave dado que si no se produce una perfecta homogeneización entre analito y spike, se verá afectada la exactitud en el resultado final. En un método de análisis por dilución isotópica siempre debe comprobarse que se ha alcanzado el equilibrio isotópico.
- 4.- Se mide una alícuota de la muestra adicionada por espectrometría de masas para determinar la relación entre las señales de analito y trazador. A partir de esa relación isotópica medida se puede determinar con exactitud la cantidad de analito en la muestra. Existen distintas formas de obtener el resultado final en función del tipo de especie a determinar (elemento, molécula orgánica o especie organometálica), que serán descritas posteriormente.
- 5.- Corrección de posibles variaciones instrumentales como pueden ser la discriminación de masa o el tiempo muerto del detector.^{18,19}

6.- Análisis de blancos. Cualquier posible contribución de la matriz o de los reactivos usados durante el análisis a la señal de la mezcla, alterará la relación isotópica medida reflejándose en forma de error sistemático en el resultado final.

A.2.4.1 Ventajas de la dilución isotópica

Siempre que se asegure el equilibrio isotópico, el análisis por dilución isotópica presenta una serie de ventajas reseñables:

-Ha sido reconocido como método primario relativo de medida por el Comité Consultivo para la Cantidad de Materia (CCQM)²⁰, ya que proporciona la más alta calidad metrológica en este campo y, por tanto, se considera y se emplea como método de referencia.

-Una vez que se alcanza el equilibrio isotópico, cualquier pérdida de sustancia en la muestra adicionada, no afectará al resultado final, dado que la relación isotópica analito/trazador se mantendrá constante en cualquier alícuota de la muestra. Las posibles transformaciones que puedan darse sobre el analito durante la preparación de la muestra serán igualmente corregidas por el trazador, dado que sus propiedades físico-químicas son prácticamente análogas a las del analito, constituyendo por tanto un patrón interno "ideal". Del mismo modo cambios en la sensibilidad instrumental, debido a efectos de matriz o deriva, serán igualmente corregidos y no afectarán al resultado final.

-La exactitud y la precisión del método dependen únicamente de la exactitud y de la precisión en la relación isotópica medida, la cual puede determinarse de manera muy precisa mediante espectrometría de masas.

-Dependiendo del tipo de analito y tipo de calibración empleada, el análisis por dilución isotópica puede proporcionar la cantidad de analito en una muestra sin necesidad de realizar rectas de calibrado, con el consiguiente ahorro en tiempo y coste por análisis.

A.2.4.2 Fuentes de error en el análisis por dilución isotópica

Para que se den las ventajas anteriormente citadas y obtener así resultados de gran calidad, deben de tenerse en cuenta ciertas consideraciones que de otro modo podrían dar lugar a errores en la determinación final:

-Cualquier pérdida de sustancia antes de que se alcance el equilibrio isotópico no será compensada y por tanto constituirá una fuente de error importante.

-Debe de asegurarse que se ha alcanzado el equilibrio isotópico y que tanto trazador como analito se comportan de igual forma a lo largo de todas las etapas del análisis.

-Deben controlarse aquellas etapas que puedan provocar procesos de discriminación entre trazador y analito tales como fraccionamiento isotópico durante la preparación de muestra (principalmente en etapas de extracción en la que se utilicen compuestos orgánicos deuterados), o discriminación de masa (principalmente durante la medida en dilución isotópica inorgánica).

-En el caso de la dilución isotópica orgánica, la marca no debe de estar en una posición en la que se pueda producir intercambio isotópico (como por ejemplo un grupo –OH deuterado) o que pueda verse afectada por cambios en el pH.

-Deben tenerse en cuenta las posibles interferencias espectrales.

-Es importante tener una estimación de la cantidad de analito que pueda haber en la muestra para así adicionar una cantidad de trazador adecuada para obtener una relación final óptima que genere el mínimo error en la determinación. En general para dilución isotópica orgánica una relación analito/spike de uno se suele considerar óptima, mientras que en análisis inorgánico se puede calcular de forma teórica a través del llamado factor de magnificación del error.²¹

-Por último debe de hacerse un control cuidadoso de los blancos ya que cualquier contaminación presente en la muestra dará lugar a una medida errónea de la relación isotópica y por tanto afectará a la exactitud del resultado final.

A.2.5. Estrategias de calibración en IDMS

Existen distintas formas de calibración en análisis por dilución isotópica dependiendo del tipo de analito (molécula orgánica o elemento metálico) y de la exactitud y precisión que se requiera.

A.2.5.1. Método gráfico

Se corresponde con el método del estándar interno pero empleando análogos marcados. Se preparan una serie de disoluciones de calibración que contienen cantidades crecientes de un patrón del analito de interés y se adiciona una cantidad constante del análogo marcado tanto a estas disoluciones como a las muestras. A partir de las medidas de relaciones de abundancia entre patrón natural y marcado se construye

una representación gráfica que permite evaluar el contenido de analito en las muestras.²² Esta estrategia es la más habitual en el análisis por dilución isotópica de compuestos orgánicos, empleando mayoritariamente análogos enriquecidos en ¹³C o deuterio y es especialmente útil cuando se deben analizar muestras con concentraciones variables de analito. En el caso de análisis por dilución isotópica inorgánico, este método no se suele emplear dado que suele existir solapamiento espectral entre los perfiles isotópicos del elemento natural y del enriquecido, con lo cual no se obtiene una representación lineal y se dificulta en gran medida el cálculo del resultado final. Una variante de este método que permite obtener una mayor exactitud y precisión, consiste en intercalar la medida de la muestra entre la medida de un estándar que contiene una concentración menor y otro que contiene una concentración mayor de analito, determinando la concentración en la muestra mediante interpolación lineal.^{23,24}

A.2.5.2 Dilución isotópica simple

Es la estrategia de calibración más sencilla y rápida pero también la que puede generar mayores incertidumbres.¹⁶ En este caso se prepara un único estándar a partir de un spike certificado en concentración y se mide la relación isotópica en la mezcla muestra/spike, a partir de la cual se obtiene la cantidad de analito mediante la ecuación de la dilución isotópica (ecuación [4]).

$$c_S = c_{Sp} \frac{m_{Sp}}{m_S} \frac{M_S}{M_{Sp}} \frac{A_{Sp}^b}{A_S^a} \left(\frac{R_m - R_{Sp}}{1 - R_m R_S} \right) \quad [4]$$

En donde c_s y c_{sp} son las concentraciones de analito y spike en la muestra, m_s y m_{sp} , las cantidades tomadas de muestra y spike, M_s y M_{sp} son los pesos atómicos/moleculares y R_s , R_{sp} y R_m , son las relaciones isotópicas del analito, del spike y de la mezcla respectivamente. Este tipo de calibración es la más habitual en dilución isotópica elemental. Como se puede observar, no hay ningún término en la ecuación que haga referencia a la sensibilidad instrumental y por tanto, al contrario que en las metodologías de calibración descritas con anterioridad, en este caso no es necesario construir curvas de calibración.

A.2.5.3 Calibración por dilución isotópica doble

Se utiliza principalmente en dilución isotópica elemental cuando no se dispone de un spike certificado. En este caso el trazador se caracteriza en un ensayo aparte. Se prepara una disolución a partir de un material enriquecido y del mismo modo se prepara una disolución de un patrón natural certificado partiendo del elemento en alta pureza (>99,9%). Se elaboran distintas mezclas patrón natural/spike y se procede al análisis del mismo modo que en cualquier ensayo convencional por dilución isotópica, con la particularidad de que en este caso la especie a determinar es la especie enriquecida y por ello este paso se conoce como dilución isotópica “inversa”. Por tanto, se puede definir para el trazador una ecuación equivalente a la ecuación [4]:

$$C_{Sp} = C_n \frac{m_n}{m_{Sp}} \frac{M_{Sp}}{M_n} \frac{A_n^a}{A_{Sp}^b} \left(\frac{1-R_m R_n}{R_m - R_t} \right) \quad [5]$$

Combinando ambas ecuaciones y asumiendo que la muestra tiene una composición isotópica igual a la del patrón natural y por tanto $R_s=R_n$ y $A_s^a=A_n^a$, se obtiene la ecuación final de la dilución isotópica doble:¹⁶

$$C_S = C_n \frac{m_n}{m_{Sp2}} \frac{m_{t1}}{m_s} \left(\frac{1-R_{m2}R_S}{1-R_{m1}R_S} \right) \left(\frac{R_{m1}-R_{Sp}}{R_{m2}-R_{Sp}} \right) \quad [6]$$

La dilución isotópica doble proporciona en general menores incertidumbres que la calibración con un solo punto ya que, tal y como puede verse en la ecuación, no hay ningún término que haga referencia a la concentración del trazador y por tanto el factor de incertidumbre asociada a la misma se elimina. De hecho no es necesario conocer con exactitud dicha concentración. La principal desventaja frente a la dilución isotópica simple es el hecho de ser más laboriosa y por tanto menos aplicable a análisis de rutina.

A.2.5.4 Método del ajuste exacto

El método del ajuste exacto podría considerarse como una variante del método de dilución isotópica doble y se puede aplicar tanto en dilución isotópica orgánica como en inorgánica.²⁵ Emplea un ajuste iterativo con el objetivo de obtener una disolución de referencia (mezcla de patrón natural y spike) con una relación isotópica exactamente igual a la de la muestra. De este modo los errores sistemáticos se reducen al mínimo y se obtienen resultados con una exactitud y precisión difícilmente igualables. Además no es necesario conocer con exactitud las abundancias isotópicas o la concentración del trazador. La Figura 3 muestra un diagrama de este procedimiento iterativo.



Figura 3 . Diagrama del procedimiento de calibración mediante el método del ajuste exacto

La primera etapa consiste en la estimación de la cantidad de analito presente en la muestra. Esto puede hacerse mediante un análisis por dilución isotópica convencional sin calibración previa del instrumento o mediante cualquier otro análisis alternativo que permita obtener una concentración aproximada. A continuación se prepara una disolución de referencia que contenga la misma cantidad de analito que la estimada. Tanto a la muestra como a la disolución de referencia se les adiciona la misma cantidad de trazador. Se seleccionan dos masas adecuadas (isótopos o fragmentos moleculares) de la especie que se desea cuantificar y se miden las relaciones isotópicas tanto de la

muestra como de la disolución de referencia y a partir de ellas se hace una nueva estimación de la cantidad de analito en la muestra, que esta vez estará más cerca del valor real. El proceso se repite partiendo de esta nueva estimación hasta que se produzca una convergencia en la cantidad de analito que denotará el valor real.

A pesar de que en general sólo dos iteraciones suelen ser suficientes, el método es bastante laborioso y por ello no aconsejable para análisis de rutina, siendo esta su principal desventaja. Este tipo de calibración es utilizado principalmente en aquellas aplicaciones donde se busca obtener la mínima incertidumbre posible como en el desarrollo de métodos de referencia utilizando dilución isotópica.^{26,27} Con posterioridad se desarrolló una alternativa basada en un ajuste aproximado,²⁸ en la que se emplea una única iteración partiendo de la premisa de que la diferencia tanto en las relaciones isotópicas como la intensidad de las señales de la disolución de calibración y muestra han de ser inferior al 5%.

A.2.5.5 Deconvolución de perfiles isotópicos

Una forma más reciente de realizar análisis cuantitativo por dilución isotópica es empleando la herramienta matemática denominada deconvolución de perfiles isotópicos o IPD (del inglés Isotope Pattern Deconvolution). Esta herramienta permite estimar la contribución individual de distintas especies de igual m/z a un determinado perfil isotópico experimental obtenido mediante espectrometría de masas. El perfil isotópico observado se considera como una combinación lineal de los patrones isotópicos de las diferentes especies isobáricas y la contribución de cada una de ellas se calcula mediante regresión lineal multivariable. Las primeras aplicaciones se desarrollaron para estudiar y corregir interferencias isobáricas.²⁹ Como se ha comentado anteriormente, la presencia de interferencias isobáricas afecta negativamente a la exactitud en la cuantificación mediante dilución isotópica ya que altera el valor real de la relación isotópica medida y por tanto el resultado del análisis. Mediante IPD también es posible corregir efectos como la discriminación de masa sin necesidad de realizar correcciones externas, siempre que se pueda medir un número de isótopos suficiente.³⁰

El IPD también puede aplicarse en el análisis por dilución isotópica para la obtención del resultado final. El perfil isotópico experimental de una mezcla muestra-trazador, se puede igualmente considerar como una combinación lineal del perfil isotópico de la muestra, de abundancias isotópicas naturales, y del perfil isotópico del trazador

enriquecido. En este caso el cálculo irá orientado al cálculo de la contribución de cada perfil isotópico, natural y enriquecido, al perfil isotópico observado en la muestra. El resultado de este proceso matemático es la fracción molar de cada uno de los perfiles isotópicos en la mezcla. El cálculo por IPD en dilución isotópica presenta una serie de ventajas. Por un lado, es una metodología general que se puede aplicar tanto en dilución isotópica orgánica como inorgánica. Por otro lado, permite trabajar con múltiples perfiles isotópicos lo cual es necesario cuando se pretenden realizar estudios de metabolismo o de especiación metálica.³¹

A.2.6 Análisis por dilución isotópica de moléculas orgánicas

Aparte de algunos trabajos publicados en estudios de metabolismo durante finales de los años 30 y principios de los años 40, el análisis por dilución isotópica de moléculas orgánicas no se popularizó hasta la década de los 70, con la llegada de nuevos desarrollos instrumentales, en especial con la comercialización de los primeros equipos de cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC-MS), y a la aparición de las primeras empresas dedicadas a la síntesis y comercialización de compuestos marcados. Como trazadores, los más habituales son aquellos enriquecidos en ^{13}C o en deuterio, aunque también se emplean compuestos marcados en ^{15}N . De igual modo fue en la década de los 70 cuando se desarrollaron las bases teóricas de la técnica. El trabajo más riguroso en este aspecto fue el publicado en 1976 por Pickup y MacPherson,³² en el cual concluyen que debido principalmente al gran número de posibles isómeros isotópicos que pueden existir en las moléculas orgánicas, las ecuaciones desarrolladas para el análisis elemental no eran en general aplicables al análisis por dilución isotópica de moléculas orgánicas y describieron las ecuaciones de un nuevo modelo teórico basado en la preparación de rectas de calibrado (el método gráfico explicado anteriormente). Este modelo es lineal siempre y cuando no haya solapamiento espectral entre los compuestos natural y marcado, con lo cual, se emplean trazadores con varios átomos marcados, de manera que los patrones isotópicos no se solapen, al existir una diferencia de masa significativa entre las especies natural y marcada. La principal ventaja de este modelo es que no es necesario conocer la composición isotópica del compuesto natural ni del marcado ni la concentración exacta de éste último siempre que sea constante en patrones y muestras.

A.2.6.1 Instrumentación

Prácticamente la totalidad de aplicaciones en dilución isotópica orgánica requieren de una extracción previa de los compuestos de interés y la posterior separación mediante una técnica cromatográfica. Por tanto la instrumentación utilizada se basa en el empleo de técnicas híbridas en las que una técnica cromatográfica se acopla a una técnica de detección por espectrometría de masas. Lo habitual es utilizar GC-MS con fuente de impacto electrónico o LC-MS con fuente de electrospray, siendo el cuadrupolo y el triple cuadrupolo los tipos de analizador más frecuentes. Idealmente, tanto el compuesto natural como el spike deben de tener el mismo tiempo de retención. En ocasiones dependiendo del tipo y número de átomos marcados del spike pueden producirse efectos isotópicos que provoquen la elución a tiempos ligeramente distintos.³³ En este caso si se produjera un cambio drástico en la sensibilidad instrumental entre la elución de ambos compuestos, éste no sería corregido, provocando un error en la determinación. Este fenómeno en general no es tan importante en el caso de GC-MS con fuente de impacto electrónico, ya que las condiciones de la fuente no se modifican durante el análisis dado que se emplean gradientes de temperatura. En el caso de LC-MS con fuente de electrospray, una fuente mucho más afectada por sustancias presentes en la matriz que pueden provocar la supresión de la ionización, y por tanto una disminución de la señal, los errores pueden ser mucho mayores. Además los gradientes empleados en cromatografía líquida, tanto de sales como de modificadores orgánicos, afectan a la eficacia del electrospray.

Dado que las señales obtenidas son de tipo transiente, la relación isotópica se mide como la relación de áreas de un determinado fragmento o ion molecular del analito y su análogo marcado. En el caso de utilizar un cuádruplo se realiza la medida mediante SIM (Selected Ion Monitoring) mientras que en el caso del triple cuádruplo el MRM (Multiple Reaction Monitoring) es el más utilizado, ya que se suele medir más de una transición.

A.2.6.2 Aplicaciones

Desde su popularización en los años 70, el análisis por dilución isotópica empleando análogos enriquecidos se ha aplicado en diversos campos en los que debido bien a la complejidad de la matriz o bien a los requerimientos de exactitud y precisión necesarios, resulta imprescindible el empleo de esta técnica. Existen numerosas

aplicaciones en análisis clínico y toxicológico,¹⁴ en análisis medioambiental,³⁴ y en estudios metabólicos de biomarcadores y biomoléculas.³⁵ Como método primario de análisis, y dado que es la metodología analítica que mejores características presenta en términos de exactitud y precisión, se emplea muy habitualmente en la certificación de materiales de referencia.^{17,36} En los últimos años esta técnica ha cobrado especial relevancia en el campo de la proteómica cuantitativa. Se han desarrollado diferentes procedimientos basados en el empleo de moléculas marcadas con el objetivo final de determinar la concentración de proteínas existente en un determinado sistema biológico. Las más habituales son: i) SILAC³⁷ (Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell cultures), en donde se introducen aminoácidos marcados, típicamente ¹³C₆-Lysina y ¹³C₆-Arginina, en el medio del cultivo celular (marcaje metabólico); ii) ICAT (Isotope Coded Affinity Tags) que se basa en introducir una marca en la cisteína mediante reacciones químicas específicas del grupo tiol y iii) iTRAQ (Isotope Tags for Relative and Absolute Quantification), en donde la marca se introduce también mediante reacción química pero en el extremo amino terminal en este caso. Cada vez está más extendido la cuantificación absoluta de proteínas empleando péptidos marcados como estándares internos, técnica conocida más generalmente como AQUA (Absolute Quantification). En este caso uno o varios péptidos marcados específicos de la proteína o proteínas a determinar se adicionan al digerido triptico de la proteína de interés, determinando mediante espectrometría de masas, normalmente en el modo MRM, la cantidad de péptido natural presente. A partir de la cantidad de péptido obtenida se obtiene directamente la cantidad de proteína.³⁸

A.2.7 Análisis por dilución isotópica elemental (inorgánica)

En este caso el analito a determinar es un elemento presente en una muestra dada. Como trazador se emplea lógicamente una disolución enriquecida en uno de los isótopos del mismo elemento y por tanto, éste debe tener al menos dos isótopos estables o con tiempos de vida media suficientemente largos. La metodología más habitual consiste en emplear un trazador certificado, que se adiciona en las primeras etapas del análisis. Si la muestra es sólida debe ponerse en disolución generalmente mediante ataque con ácidos en microondas utilizando recipientes cerrados para evitar pérdidas. La digestión de la muestra debe ser cuantitativa para asegurar el equilibrio isotópico. Una vez alcanzado el equilibrio isotópico cualquier pérdida de muestra posterior que ocurra en otras etapas de preparación de muestra, no afectará al resultado final ya que el valor a

determinar finalmente será la relación isotópica R_m entre analito y spike, la cual es constante en cualquier alícuota que se tome de la mezcla. Finalmente y dado que se emplea un trazador certificado, la cantidad de elemento en la muestra se determina por dilución isotópica simple utilizando la ecuación [4]. De este modo se pueden cuantificar múltiples muestras con excelente exactitud y precisión y además de forma rápida dado que no es necesario construir curvas de calibración.

A.2.7.1 Instrumentación

Tradicionalmente la determinación de trazas y ultratrazas metálicas por dilución isotópica se llevaba a cabo empleando TIMS³⁹ como técnica de análisis. Debido a su exactitud y precisión se ha empleado en la certificación de materiales de referencia y también se han desarrollado numerosas aplicaciones para la determinación de ultratrazas metálicas.⁴⁰ No obstante, es principalmente en este último campo en donde TIMS ha quedado relegada a un segundo plano con la aparición del ICPMS (plasma de acoplamiento inductivo) a finales de los años 80, debido principalmente a que es una técnica más sencilla y versátil, multielemental, con elevada sensibilidad para la mayoría de elementos, requiere mucha menor preparación de muestra y puede utilizarse como sistema de detección en línea y, por tanto, puede acoplarse a sistemas cromatográficos.

A.2.7.2 Aplicaciones en dilución isotópica elemental

El análisis por dilución isotópica con ICPMS ha sido ampliamente utilizado en la determinación multielemental⁴¹ de trazas metálicas en multitud de matrices distintas, como pueden ser acuosas,⁴² geológicas⁴³ y biológicas⁴⁴ y en muy diversos campos tales como medioambiental y biológico,⁴⁵ forense⁴⁶ o en la certificación de materiales de referencia.^{16,47}

Aparte de en la cuantificación de elementos totales, uno de los campos en donde más se ha extendido el uso de la dilución isotópica con ICPMS es en el de la especiación elemental. El análisis de especiación implica determinar no sólo la cantidad total de un elemento en una muestra, si no de cada una de las especies en las que ese elemento está presente. Este interés deriva del hecho de que las distintas especies de un elemento tendrán distinta toxicidad y biodisponibilidad y se distribuirán de manera diferente entre los distintos compartimentos medioambientales y biológicos. En este caso la especie a determinar es una molécula orgánica pero a diferencia de la dilución isotópica orgánica, en la que se emplean trazadores deuterados o marcados con ^{13}C , en este caso la marca es

un isótopo de un elemento detectable por ICP-MS presente en la misma. Dado que el ICP es una fuente de ionización elemental y por tanto no proporciona ningún tipo de información acerca de la identidad de los analitos, para poder hacer especiación, es necesario separar e identificar previamente las distintas especies a analizar. Para ello se emplean las denominadas técnicas híbridas, que implican el acoplamiento de una técnica de separación, normalmente cromatográfica, con una técnica de espectrometría de masas. El acoplamiento HPLC-ICPMS es el más ampliamente utilizado en especiación metálica,²¹ aunque también es frecuente el uso de cromatografía de gases acoplada a ICP.⁴⁸

Uno de los campos de mayor interés analítico en la actualidad en donde la dilución isotópica con ICPMS está demostrando un gran potencial es en el bioanálisis y en concreto en la proteómica cuantitativa.⁴⁹ Las características de esta fuente de ionización en cuanto a robustez, sensibilidad y especificidad elemental la convierten en una buena alternativa a las técnicas más comúnmente utilizadas en proteómica cuantitativa⁵⁰ basadas en el empleo de fuentes de ionización suaves como MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) y ESI (Electrospray Ionization). Dichas fuentes se ven mucho más seriamente afectadas por la matriz que el ICP y además, su respuesta depende del compuesto a analizar y por tanto, en principio son menos adecuadas para análisis cuantitativo. Este hecho unido a la falta de patrones y materiales de referencia y a la tremenda complejidad y pequeño tamaño de las muestras hace que el análisis cuantitativo de proteínas sea uno de los mayores retos analíticos en la actualidad.^{51,52}

A raíz del desarrollo de aplicaciones en el análisis de especiación empleando técnicas híbridas, principalmente HPLC-ICP-MS, Rottmann y Heumann sentaron las bases de una nueva modalidad de dilución isotópica, basada en el empleo de un único trazador enriquecido que se adiciona en continuo tras una separación cromatográfica.⁵³ Esta modalidad se conoce como “species-unspecific isotope dilution” o dilución isotópica en línea, técnica en la cual se basa la presente tesis doctoral y que será descrita en detalle en el apartado siguiente.

A.3 DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA

A.3.1 Cuantificación independiente del compuesto

Como ya se ha comentado anteriormente, cuando se pretende cuantificar una sustancia mediante una técnica instrumental, es necesario calibrar la respuesta del detector para cada especie de interés construyendo curvas de calibración a partir de disoluciones de concentración conocida de estándares específicos. Sin embargo, algunos sistemas de detección elemental son capaces de generar una respuesta para un determinado elemento independientemente de la forma química de la que forme parte. Esta particularidad hace que sea posible emplear un único patrón genérico que contenga el elemento de interés para cuantificar las distintas especies en las que ese elemento pueda estar presente en una determinada muestra. Las principales ventajas de este tipo de cuantificación son evidentes: sólo se requiere un único patrón y por tanto no es necesario adquirir patrones de calibración ni construir rectas de calibrado para cada uno de los compuestos que se pretendan analizar y sobre todo, permite la cuantificación de sustancias para las cuales no existen patrones puros disponibles comercialmente.

Las primeras aplicaciones se desarrollaron utilizando cromatografía de gases acoplada a MIP (Microwave Induced Plasma) y detección por emisión atómica.^{54,55} La capacidad de este sistema de detección para obtener resultados cuantitativos o semi-cuantitativos sin patrones ha quedado patente en distintas aplicaciones que van desde análisis de especiación⁵⁶ hasta la determinación de compuestos orgánicos halogenados,⁵⁷ nitrogenados⁵⁸ o sulfurados.⁵⁹ También se ha demostrado su aplicabilidad a la determinación de hidrocarburos en mezclas modelo a partir de la relación carbono-hidrógeno, consiguiendo buena exactitud y precisión bajo ciertas condiciones experimentales, utilizando un plasma de He enriquecido en oxígeno.⁶⁰ Aún con todas sus aparentes ventajas, el uso de la técnica GC-MIP-AES no ha sido demasiado extenso quedando relegada a un segundo plano más aún tras la aparición del plasma ICP, más sensible y robusto. Con ICP-MS como sistema de detección se han desarrollado aplicaciones basadas en su capacidad de cuantificación independiente del compuesto tanto acoplado a GC para el análisis de compuestos organoclorados,⁶¹ como a HPLC para la cuantificación de fosfopéptidos⁶² y péptidos yodados⁶³. También se ha demostrado su capacidad para la cuantificación independiente del compuesto en otros elementos de interés biológico y medioambiental.⁶⁴ Más recientemente se ha evaluado

la descarga luminiscente o “Glow Discharge” (GD) de micropulsos en la cuantificación independiente de compuestos halogenados volátiles.⁶⁵

La capacidad del ICP-MS de generar una respuesta instrumental para un determinado elemento independiente de la especie química en la que esté presente permitió el desarrollo de una nueva modalidad de dilución isotópica que mejora las características analíticas de la calibración independiente del compuesto mediante la adición en continuo de un trazador genérico enriquecido.

A.3.2 El concepto de la dilución isotópica en línea

Los primeros sistemas por inyección en flujo empleados para realizar análisis por dilución isotópica, se diseñaron a finales de los años 80 y principios de los 90, para la determinación de Pb.^{66,67} En este sistema se alternaban varias inyecciones de muestra y spike en un mismo carrier. En 1993 Klinkenberg y col.⁶⁸ diseñaron el primer sistema FIA-ICP-MS en el que un volumen discreto de muestra o estándar se inyectaba en un carrier que contenía la especie enriquecida, ¹²⁵Te en este caso, de tal manera que el trazador se dispensaba de manera continua, y lo aplicaron a la determinación de Teluro en aguas de vertidos industriales. Los mismos autores adaptaron las ecuaciones de la dilución isotópica clásica a este nuevo sistema,⁶⁹ y posteriormente aplicaron la metodología a la determinación de Cr, Cd, Hg y Pb en dos materiales de polietileno dentro del proyecto PERM (Polymer Elemental Reference Material), centrándose principalmente en la determinación de la incertidumbre de la técnica.⁷⁰

Los principios de la dilución isotópica en línea para el análisis de especiación elemental, fueron definidos por Heumann y Rottmann en 1994 y aplicados a la determinación de complejos metálicos de cromo y molibdeno con sustancias húmicas.⁵³ Los autores hablan en este caso de dilución isotópica específica (species-specific isotope dilution), cuando el trazador es la propia especie objeto de análisis sólo que enriquecida en uno de los átomos que la conforman. Del mismo modo se refieren a la dilución isotópica en línea como dilución isotópica inespecífica (species-unspecific isotope dilution). Esto se debe a que en este caso se emplea un spike genérico que contenga el elemento que se desea cuantificar, el cual puede ser una especie que no esté presente en la muestra o incluso una disolución del propio elemento enriquecido. Es por tanto requisito imprescindible comprobar con estándares adecuados que la condición de

respuesta independiente del compuesto se cumple para cada elemento o especie de interés.

El concepto de la dilución isotópica en línea es muy intuitivo. La Figura 4 muestra un esquema del proceso. Por un lado, un flujo másico o molar (mol/unidad de tiempo) normalmente variable del elemento a determinar presente en la muestra, y que por tanto tendrá abundancias isotópicas naturales, se mezcla en continuo con un flujo constante del spike que contiene ese mismo elemento pero con abundancias alteradas. De este modo se obtiene un flujo resultante cuya relación isotópica se mide continuamente en el espectrómetro de masas. El flujo variable de analito se obtiene en general mediante un sistema cromatográfico o un sistema FIA tal y como puede verse en el FIAGrama de la figura en color gris (F_s) en donde también se puede apreciar la señal constante correspondiente al trazador (F_{sp} , en color negro). En este caso el equilibrio isotópico, requisito imprescindible para poder cuantificar por dilución isotópica, tiene lugar en la propia fuente de ionización. Dentro del plasma todas las moléculas se rompen en los átomos que las componen produciéndose la completa homogeneización del elemento natural con el elemento enriquecido.

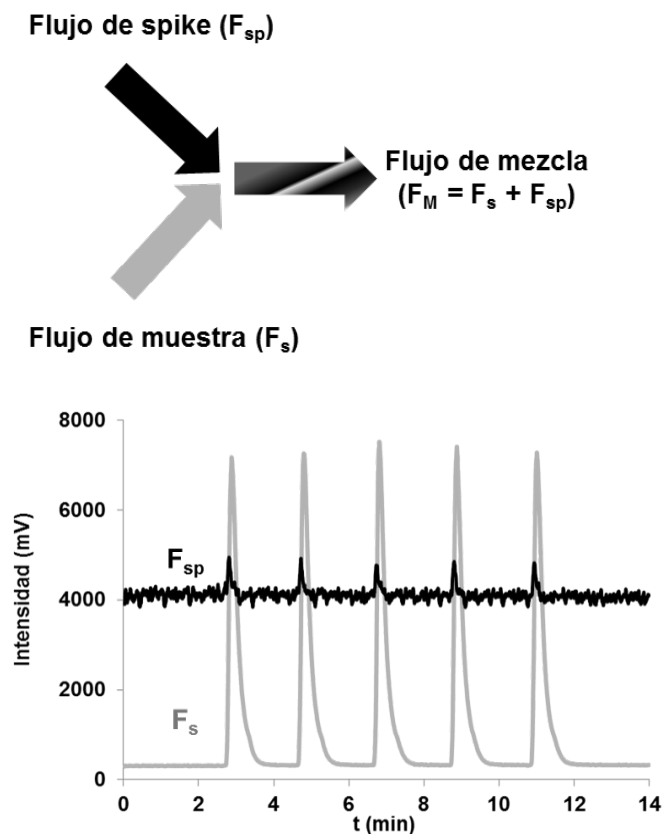


Figura 4. Concepto de la dilución isotópica en línea

A.3.3 Ecuaciones de la dilución isotópica en línea

De acuerdo con el esquema de la Figura 4, una muestra que contiene una concentración del elemento a determinar C_S (mol/g), eluye de un sistema cromatográfico o FIA a un determinado flujo F_S (g/min) y se mezcla en continuo con el spike, que a su vez tendrá una concentración C_{Sp} del elemento enriquecido y será adicionado a un determinado flujo F_{Sp} . Por tanto, en la mezcla resultante el flujo molar total del elemento M_m (mol/min) vendrá dado por:

$$M_m = C_S F_S + C_{Sp} F_{Sp} = M_S + M_{Sp} \quad [7]$$

Como ya se ha mencionado anteriormente, el flujo molar del trazador es constante, sin embargo el flujo molar del elemento natural en la muestra normalmente varía con el tiempo, como por ejemplo durante un pico cromatográfico o cuando eluye la muestra de un sistema FIA, tal y como puede verse en el FIAGrama de la Figura 4. Por tanto el flujo molar total también variará en función del tiempo. Si suponemos un elemento con dos isótopos a y b, se puede establecer un balance de masa para cada uno de ellos, de manera que el flujo molar para cada isótopo vendrá dado por:

$$M_m A_m^a = M_S A_S^a + M_{Sp} A_{Sp}^a \quad [8]$$

$$M_m A_m^b = M_S A_S^b + M_{Sp} A_{Sp}^b \quad [9]$$

En donde A^a y A^b son las abundancias de los isótopos a y b en la mezcla (m), muestra (s) y spike (sp) respectivamente. Si dividimos ambas expresiones obtenemos:

$$R_m = \frac{M_S A_S^a + M_{Sp} A_{Sp}^a}{M_S A_S^b + M_{Sp} A_{Sp}^b} \quad [10]$$

En donde R_m es la relación de abundancias isotópicas en la mezcla ($R_m = A_m^a/A_m^b$), que lógicamente también cambiará con el tiempo siempre que M_S cambie. Despejando M_S de la ecuación anterior y sustituyendo M_{Sp} por $C_{Sp}F_{Sp}$:

$$M_S = C_{Sp}F_{Sp} \frac{R_m A_{Sp}^b - A_{Sp}^a}{A_S^a - R_m A_S^b} \quad [11]$$

Se obtiene de este modo la ecuación básica para la dilución isotópica en línea. Como se puede observar, conociendo la concentración y el flujo del spike y midiendo R_m en función del tiempo mediante espectrometría de masas, se puede calcular el flujo molar de elemento natural presente en la muestra.

A.3.4 Cuantificación por dilución isotópica en línea: cromatograma de flujo molar

La dilución isotópica en línea implica la medida de señales transientes obtenidas tras una separación cromatográfica o un análisis por FIA. La información cuantitativa en estos casos se obtiene de la representación del flujo molar del elemento natural frente al tiempo, que se conoce como cromatograma (o fiagrama) de flujo molar. Para ello es necesario disponer de los datos del cromatograma punto por punto (tiempo, señal para el isótopo a y señal para el isótopo b). En la Figura 5 puede verse el proceso esquematizado. A partir del cromatograma de intensidades se calcula la relación isotópica R_m en cada punto dividiendo el valor de intensidad obtenido para el isótopo a entre el correspondiente valor para el isótopo b.

Cualquier posible fuente de error sistemático como discriminación de masa, tiempo muerto del detector o interferencias espectrales debe corregirse. Introduciendo estos valores de R_m corregidos en la ecuación [11], se obtiene el valor M_S en cada punto. Representando M_S frente al tiempo se obtiene el cromatograma de flujo molar. Como se puede ver en la figura, el eje de abscisas tiene unidades de flujo molar (pmol/min) mientras que en el de ordenadas se representa el tiempo (min). De este modo la integración de cada pico en el cromatograma (ecuación [12]) proporciona de manera directa la cantidad de elemento natural m_S que ha eluído en ese intervalo.

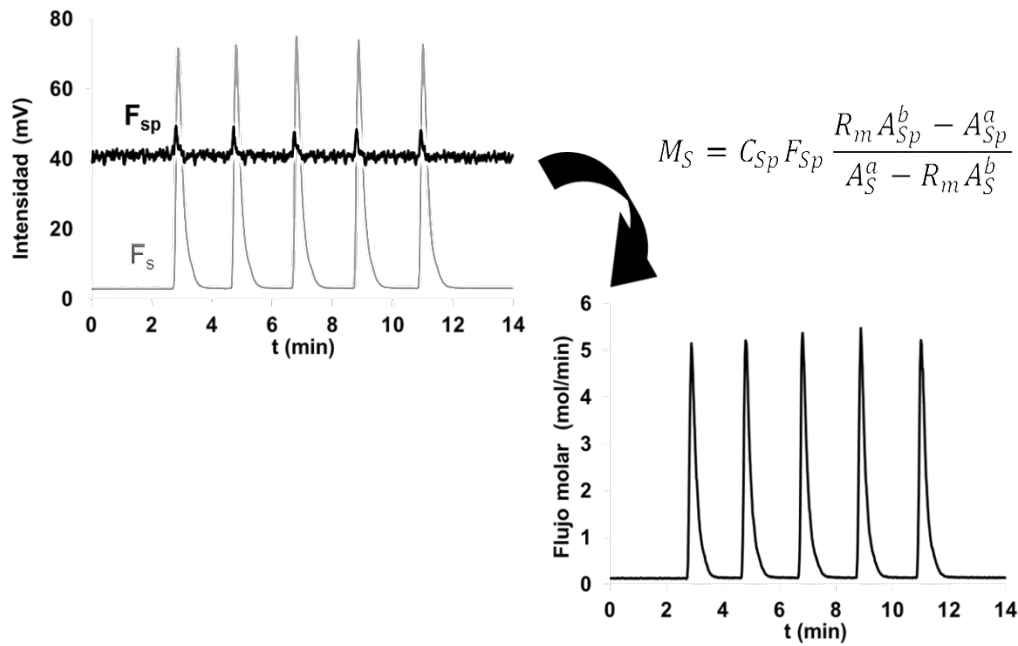


Figura 5. Obtención del cromatograma de flujo másico a partir de las señales instrumentales y la aplicación de la ecuación

$$m_S = \int_{t_1}^{t_2} M_S(t) dt = C_{Sp} F_{Sp} \int_{t_1}^{t_2} \frac{R_m(t) A_{Sp}^b - A_{Sp}^a}{A_S^a - R_m(t) A_S^b} dt \quad [12]$$

En donde t_1 y t_2 representan el principio y el final del pico respectivamente. Partiendo de la cantidad calculada de elemento se puede obtener fácilmente la cantidad de compuesto correspondiente a cada uno de los picos del cromatograma (o fiagrama) si se conocen sus fórmulas moleculares respectivas.

A.3.4.1 Dilución isotópica en línea con patrón interno

Para poder obtener la cantidad de analito que eluye con el tiempo mediante la ecuación [11], el flujo molar del spike debe conocerse con exactitud. Si el spike es una disolución acuosa, normalmente se adiciona mediante una bomba peristáltica o de jeringa. En este caso se puede calibrar el flujo molar de manera exacta y precisa conociendo la concentración de la disolución y calibrando por pesada el flujo impulsado por la bomba. Sin embargo en el caso de que se emplee un trazador en fase gas, o bien cuando no se dispone de un trazador certificado, el cálculo exacto del flujo molar dispensado es difícil. Para evitar este problema Heilmann y Heumann desarrollaron un método consistente en la adición de una cantidad exacta de un patrón interno a las

muestras.⁷¹ Del mismo modo que para m_S , se puede definir una ecuación análoga a la ecuación [12] que permita calcular la cantidad de patrón interno m_{EI} correspondiente al estándar interno. Dado que la ecuación [12] está directamente correlacionada con el área del pico de la especie a determinar, si se divide esa ecuación entre la correspondiente análoga para el patrón interno, se obtiene la siguiente relación:

$$m_S = m_{EI} \frac{A_S}{A_{EI}} \quad [13]$$

A partir de la ecuación [13] puede determinarse la cantidad de elemento natural que eluye en un pico simplemente calculando las áreas tanto de la especie elemental a determinar como del patrón interno y asumiendo un flujo molar arbitrario para el trazador, es decir, no es necesario conocer con exactitud ni la concentración ni el flujo que se adiciona de trazador para poder cuantificar las especies presentes en la muestra, siempre y cuando no exista discriminación entre el patrón interno y los compuestos objeto de análisis. Ésta estrategia resulta de gran utilidad y simplifica considerablemente el análisis por dilución isotópica en línea dado que la principal fuente de incertidumbre se encuentra precisamente en la determinación exacta y precisa del flujo másico de trazador, tal y como demostraron Koellensperger y col., utilizando cisplatino y sus dos productos de hidrólisis para evaluar la incertidumbre en la medida por SU-IDMS. Para ello compararon dos métodos de calibración del flujo másico del trazador, por gravimetría y mediante el uso de un patrón natural. Se demostró que la principal fuente de incertidumbre del proceso era precisamente la calibración del flujo másico, y que la determinación gravimétrica del mismo proporcionaba valores mucho más exactos en la cuantificación (incertidumbre combinada 8%) que la calibración mediante un patrón natural (17%).⁷²

Lógicamente el patrón interno seleccionado no debe co-eluir con los analitos de interés. Otra ventaja adicional de utilizar un patrón interno en la cuantificación por dilución isotópica en línea, es que las incertidumbres en los volúmenes de inyección no tendrán efecto en el resultado final dado que la relación de áreas A_S/A_{EI} es independiente del volumen introducido. De este modo se corrigen las pequeñas variaciones en el volumen inyectado como consecuencia de los pequeños volúmenes que se utilizan en cromatografía de gases (1-2 μL típicamente) y, en el caso de análisis por FIA o HPLC, no es necesario saber con exactitud el volumen del bucle de inyección.

A.3.5 Instrumentación para dilución isotópica en línea

La configuración más sencilla consiste en una única bomba peristáltica mediante la cual se impulsa tanto la muestra como el trazador, mezclándose ambos flujos en una “T” de mezcla antes de la fuente de ionización. En este caso la relación isotópica medida es constante con el tiempo. Otra alternativa es mediante un sistema FIA, utilizando una válvula de seis vías con un bucle de inyección para introducir un determinado volumen de muestra antes de la mezcla con el spike. Cuando se inyecte la muestra y el segmento con el analito llegue al detector, se producirá un cambio en la relación isotópica debido a la contribución del elemento de abundancias naturales que procede de dicho analito. No obstante, lo más habitual es cuantificar las especies que eluyen de un sistema cromatográfico o electroforético, con adición post-columna del trazador. La Figura 6 muestra un esquema de la configuración más habitual para análisis por dilución isotópica post-columna, utilizada en análisis de especiación elemental. Tras la separación de las especies de interés por HPLC, el trazador se adiciona de forma continua utilizando normalmente una bomba peristáltica y se mezcla con el flujo que proviene de la columna en una “T” de mezcla, para posteriormente producirse el equilibrio isotópico en el plasma y la posterior medida de la relación isotópica en el espectrómetro de masas. Cabe destacar que es posible la automatización de esta técnica en cualquiera de sus configuraciones acoplando un automuestrador.

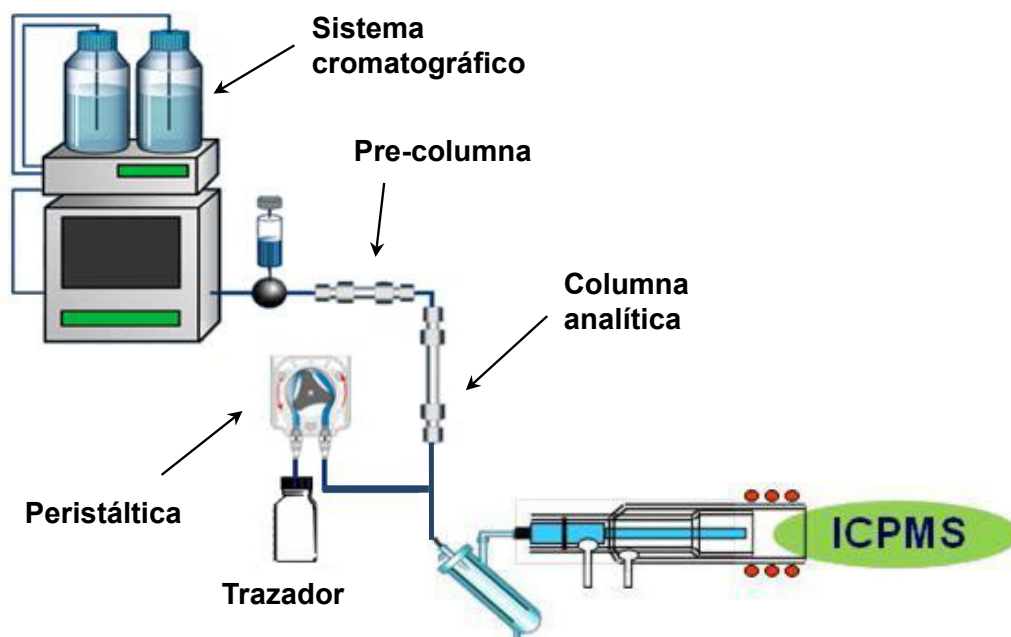


Figura 6. Configuración instrumental para análisis por dilución isotópica post-columna

A.3.6 Ventajas y desventajas de la dilución isotópica en línea

La adición en continuo de un spike genérico tiene como principal ventaja la posibilidad de cuantificar diferentes especies que contengan un elemento en común sin necesidad de disponer de patrones específicos para cada uno de ellos. En este sentido puede considerarse como un sistema de detección cuantitativo genérico para cromatografía dado que proporciona información en tiempo real sobre la cantidad de un determinado elemento en masa o moles que eluye del sistema cromatográfico. Es especialmente útil en la determinación de moléculas para las cuales no existen patrones disponibles comercialmente, evitando tener que sintetizarlos, purificarlos y certificarlos en el laboratorio. Otra ventaja es que permite estudiar de forma cuantitativa procesos no cuantitativos, tales como etapas de extracción o pre-concentración. Dado que proporciona la cantidad de elemento eluido es una herramienta excelente para llevar a cabo estos estudios de recuperación. Además cualquier posible fuente de inestabilidad en la señal analítica, debido a deriva instrumental o efectos de matriz es corregida en tiempo real por el spike. Este hecho podría resultar ventajoso en análisis de rutina ya que evitaría la necesidad de medir estándares de control de calidad cada cierto número de muestras.

Sin embargo el hecho de que la adición de la especie enriquecida tenga lugar al final del proceso analítico, previamente a la etapa de medida, hace que la dilución isotópica en línea presente una desventaja muy importante sobre la dilución isotópica específica. En esta última la mayoría de las posibles fuentes de error que se presentan en las distintas etapas de tratamiento de muestra son corregidas dado que la adición del trazador se realiza en las etapas iniciales del análisis. Esto no es posible utilizando dilución isotópica en línea y por tanto, no es una técnica recomendable para cuantificar con elevada exactitud muestras muy complejas en las que sea necesario llevar a cabo varias etapas de preparación antes de la medida. Además es imprescindible evaluar la recuperación de la columna cromatográfica ya que procesos tales como absorciones inespecíficas o la degradación en la columna de las especies de interés no son compensados.⁷³ Cuanto menor sea el número de etapas de preparación de la muestra, mejor será la exactitud obtenida. Otra limitación de la técnica como consecuencia de utilizar un ICP-MS es que los principales constituyentes de la materia orgánica (C, H, O y N) no son analizables por ICP y por tanto su empleo en el análisis de moléculas orgánicas, cuyos componentes mayoritarios son precisamente estos elementos, está

bastante restringido. Otro factor a tener en cuenta, son las eficacias de la nebulización que, en el caso de especies muy distintas, pueden ser significativamente diferentes, afectando al resultado final. Además el empleo de una fuente de ionización elemental como el ICP, en la que la información molecular se pierde, hace que sea necesario recurrir a otras técnicas para identificar las especies de interés y además, exige la separación a línea de base de las especies a cuantificar.

A.3.7 Aplicaciones de la dilución isotópica en línea

Como ya se ha comentado las primeras aplicaciones se desarrollaron con objeto de determinar elementos metálicos mediante análisis por inyección en flujo utilizando distintas configuraciones. Aparte de las ya comentadas, existen en la literatura aplicaciones para la determinación directa de Pb en vinos y orina, comparando distintas técnicas de calibración,⁷⁴ o aplicado a la determinación de Pt.⁷⁵ No obstante donde la dilución isotópica en línea ha tenido una mayor expansión ha sido en el análisis de especiación elemental y en la cuantificación de proteínas. En estos casos resulta una técnica muy útil dado que en general no existen patrones certificados de péptidos o proteínas ni de muchas de las especies elementales de interés analítico.

A.3.7.1 Dilución isotópica en línea en análisis de especiación y proteómica cuantitativa

La primera aplicación de la dilución isotópica en línea en análisis de especiación descrita por Rottmann y Heumann se aplicó a la determinación de complejos de Mo y Cu con sustancias húmicas en materia orgánica disuelta en aguas de río, así como a la especiación de yodo utilizando ^{129}I como trazador.^{53,76} Dado que no era posible sintetizar dichos complejos en el laboratorio, desarrollaron un método alternativo basándose en la capacidad del ICP de producir una respuesta para un determinado elemento independiente de su forma química. Para ello recurrieron a cromatografía de exclusión por tamaños para la separación de las distintas fracciones de interés. Definieron esta técnica como “species-unspecific”-IDMS (SU-IDMS) por contraposición a la dilución isotópica convencional, en donde se emplea como trazador enriquecido la misma especie a determinar y que denominaron “species-specific”-IDMS. Posteriormente aplicaron la misma metodología a la determinación de complejos de Ni, Pb y Fe con materia orgánica en disolución.⁷⁷ Además caracterizaron distintos tipos de aguas, residuales, vertidos, de mar, continentales, en función de su perfil

característico de metales pesados (Ag, Cd, Tl, U, W, Zn y Zr) y de los complejos anteriormente mencionados utilizando una disolución multielemental como spike.⁷⁸

Basándose en el mismo principio, desde el mismo grupo de investigación se desarrolló una metodología para la determinación simultánea de metales pesados y de carbono orgánico disuelto (DOC), tanto el total presente en las muestras como en diversas fracciones cromatográficas obtenidas por SEC.⁷⁹ Para ellos utilizaron como spike una mezcla que contenía ácido benzoico enriquecido en ^{13}C para determinar el DOC monitorizando la señal correspondiente al carbono (iones $^{12}\text{C}^+$ y $^{13}\text{C}^+$) a la que se adicionaban distintos isótopos enriquecidos de metales pesados (^{65}Cu , ^{62}Ni , ^{97}Mo , ^{206}Pb , y ^{68}Zn) para su cuantificación. En la Figura 7 se muestra un esquema del sistema empleado. Cabe destacar que esta es la única metodología descrita en la que se determina carbono mediante dilución isotópica post-columna HPLC-ICP-MS. Los límites de detección obtenidos ($0,7 \text{ ng Cs}^{-1}$), aunque adecuados para esa aplicación en particular, distan mucho de los valores habituales del ICP-MS para la mayoría de elementos. Esto es debido principalmente al elevado potencial de ionización del carbono (11,2 eV) que hace que la eficacia de ionización en el plasma no sea demasiado buena, así como al elevado fondo que presenta el ICP para este elemento en cuestión debido a que es una fuente de ionización a presión atmosférica.

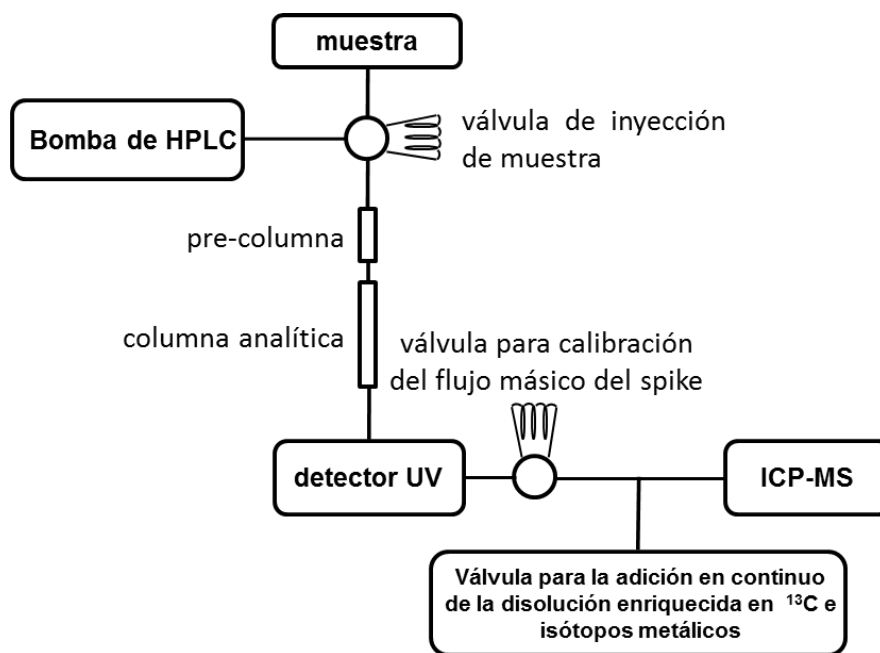


Figura 7. Esquema del sistema HPLC-ICP-IDMS para la determinación simultánea de carbono orgánico disuelto y metales pesados en aguas.

La dilución isotópica en línea se ha empleado para llevar a cabo la especiación de metales esenciales en suero humano,⁸⁰ en concreto Cu, Fe y Zn en proteínas séricas como la transferrina y la albúmina, demostrando la importancia de la especiación del hierro en el diagnóstico de ciertas enfermedades. De hecho con posterioridad se empleó la dilución isotópica post-columna en la cuantificación de proteínas férricas en suero y fluido cerebroespinal, con objeto de ser estudiadas como posibles biomarcadores de enfermedades (p.ej. alcoholismo crónico).^{81,82,83}

Se han descrito numerosas aplicaciones basadas en SU-IDMS para la determinación de isoformas de metalotioneínas a partir del azufre de su estructura y de los metales que llevan asociados. Estas proteínas participan en la detoxificación de metales pesados y pueden utilizarse como biomarcadores ya que son inducidas en los organismos tanto por metales esenciales (Cu, Zn) como no esenciales (Cd, Ag, Hg, Pb). Así se han determinado metalotioneínas por SU-IDMS en matrices biológicas tales como hígado de distintas especies animales, con el objetivo de estudiar la exposición y bioacumulación de metales tóxicos en organismos vivos, se ha estudiado la estequiometría de los complejos metálicos mediante la relación metal/azufre, y se han determinado en tejido cerebral de pacientes afectados por alzheimer, dado que se cree que una de las isoformas de estas proteínas, la MT3, participa de alguna manera en el desarrollo de esta enfermedad.^{84,85}

Además de en el caso de las metalotioneínas, el azufre ha sido uno de los elementos más utilizado en la mayoría de las aplicaciones en las que se cuantifican proteínas por SU-ICP-IDMS. La razón principal es que el azufre está presente de forma natural en algunos aminoácidos (cisteína y metionina) y por tanto se encuentra en la mayoría de péptidos y proteínas. Además, sí se puede medir mediante ICP-MS con límites de detección aceptables, no como en el caso de los elementos C, H, N, O. Otra ventaja se debe a que el hecho de formar parte de la estructura de los aminoácidos elimina el riesgo de pérdidas del elemento durante las etapas de preparación de muestra y medida, como puede ocurrir con el metal coordinado de muchas metaloproteínas. Para su detección, dado que se trata de un elemento fuertemente interferido, se emplean normalmente espectrómetros de masas de doble enfoque, que permiten trabajar a media o alta resolución, o bien instrumentos de tipo cuadrupolo con celda de colisión o reacción, con el objetivo de eliminar dichas interferencias. Se han diseñado y propuesto distintas estrategias para la cuantificación absoluta de proteínas mediante azufre y

dilución isotópica post-columna empleando como proteínas modelo seroalbúmina bovina y superóxido dismutasa,⁸⁶ apolipoproteína humana A1 y α -fetoproteína.⁸⁷ También se han diseñado metodologías en las que el trazador se adiciona antes de la separación cromatográfica, como aditivo en la fase móvil, con el objetivo de evitar la etapa de mezcla y el uso de una bomba adicional, y de minimizar los volúmenes muertos, demostrando su aplicabilidad a la determinación de péptidos trípticos⁸⁸. Además de a la cuantificación de proteínas el análisis por SU-IDMS se ha aplicado también a la determinación de pequeñas biomoléculas de azufre.⁸⁹ El principal reto en los próximos años en este campo es el de mejorar tanto las técnicas de separación como los límites de detección para azufre.⁹⁰ En este sentido se ha comenzado a comercializar recientemente un nuevo tipo de ICP-MS de triple cuadrupolo que permite disminuir sensiblemente los límites de detección para el azufre.⁹¹ De hecho, el principal factor limitante para seguir mejorando los límites de detección, son los blancos.

El análisis mediante SU-ICP-IDMS también se ha aplicado a la determinación de compuestos derivados del tiofeno en gasóleos.⁷¹ Cabe destacar que esta aplicación era hasta la fecha la única en que se utilizaba cromatografía de gases como técnica de separación en combinación con un trazador post-columna en fase gas, sulfuro de dimetilo, enriquecido en ^{34}S en este caso. Para acoplar el cromatógrafo de gases al ICP se construyó una interfase consistente en una línea de transferencia calentada, una unión Swagelok y un adaptador de vidrio para acoplarla a la antorcha del ICP. Para producir el flujo de spike gaseoso, se acopló a la entrada del carrier un cilindro presurizado con argón en el que se introducía el sulfuro de dimetilo enriquecido, cuyo flujo regulaban mediante un controlador de flujo másico. También se ha utilizado un trazador en estado gaseoso para la determinación de mercurio y metilmercurio en muestras biológicas en la que se empleaba como spike ^{200}Hg que se adicionaba en fase vapor mediante un tubo de permeación.⁹²

Otro elemento típicamente analizado por SU-ICP-IDMS es el selenio debido a su condición de elemento esencial en los seres vivos y a que además presenta actividad anticancerígena. Por ello el estudio del metabolismo del selenio y de sus distintas especies conlleva un gran interés.⁹³ Se han realizado numerosos estudios de especiación cuantitativa por SU-IDMS en diferentes matrices biológicas tales como levadura y harina de trigo,⁹⁴ setas,⁹⁵ colon de rata,⁹⁶ y suero humano⁹⁷ empleando distintas técnicas cromatográficas, exclusión por tamaños, fase reversa o intercambio aniónico,

en función de cada aplicación. Normalmente se utiliza celda de reacción presurizada con H₂ para eliminar las interferencias de dímeros de Ar, en las masas del selenio y el ⁷⁷Se es el trazador post-columna más habitual. También se han desarrollado y optimizado distintas estrategias para la determinación de selenio asociado a proteínas séricas, en concreto glutatión peroxidasa (GSH-Px), selenoproteína P (SePP) y selenoalbúmina (SeAlb), empleando cromatografía de afinidad para aislar las distintas fracciones.⁹⁸ La dilución isotópica post-columna también se ha utilizado como herramienta de cuantificación de especies de selenio y de selenio total en estudios metabólicos “in vivo” en el que se suministran isótopos enriquecidos de selenio a animales para posteriormente estudiar la distribución de este elemento en el organismo.^{99,100}

El interés del cisplatino debido a su empleo como fármaco en quimioterapia y a su elevada nefrotoxicidad, ha motivado el desarrollo de técnicas basadas en SU-HPLC-ICP-IDMS para la determinación de cisplatino y sus productos de degradación en agua y en orina de pacientes en tratamiento, con el objetivo de estudiar la cinética de degradación de este compuesto,¹⁰¹ o para la cuantificación de los aductos de este compuesto con el ADN generados “in vivo”.¹⁰²

Recientemente Cuyckens, Meermann y col. han demostrado la gran utilidad de la SU-IDMS en el estudio de los metabolitos de un fármaco contra la tuberculosis, probado primero en animales y posteriormente en humanos.^{103,104} Lógicamente no existen estándares disponibles para los metabolitos de un fármaco en fase experimental, y por tanto no pueden utilizarse fuentes de ionización moleculares (electrospray), para obtener datos cuantitativos, dado que la sensibilidad de estas fuentes es fuertemente dependiente de la estructura del compuesto analizado. Buscando una alternativa a los métodos radiométricos tradicionales con ¹⁴C o ³H, emplearon el acoplamiento HPLC-ICP-MS para la cuantificación de los distintos metabolitos, midiendo la señal del bromo presente en su estructura, y adicionando un flujo post-columna de Na⁸¹Br, que permitió corregir la variación en la sensibilidad del ICP debido a los gradientes de HPLC y cuantificar los distintos analitos de interés. Estas dos publicaciones ponen de manifiesto la complementariedad entre las técnicas de masas moleculares (ESI, orbitrap), que fueron utilizadas para identificar o confirmar las diferentes especies, y las técnicas elementales, ICP-MS en este caso, que mediante el empleo de la dilución isotópica post-

columna permitió obtener un perfil metabólico cuantitativo de especies para las cuales no existen patrones comerciales.

A.4 EVALUACIÓN DE LA PUREZA QUÍMICA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS

La determinación de la pureza de una sustancia es importante por diversos motivos. Es imprescindible conocer la pureza para poder predecir el resultado de reacciones químicas y biológicas. Es de especial importancia en el desarrollo y la fabricación de fármacos. Además, la evaluación de la pureza química es una de las etapas esenciales en la producción de estándares y materiales de referencia orgánicos, que serán posteriormente utilizados como patrones de calibración en análisis químico cuantitativo. La determinación de la pureza de una sustancia no es un proceso sencillo, siendo una de sus mayores dificultades la falta de patrones certificados tanto para el componente principal como, sobre todo, para las distintas impurezas en el caso de una determinación indirecta. De hecho en muchos casos hay que recurrir al empleo de métodos primarios de análisis además de a otras técnicas alternativas de confirmación.¹⁰⁵

Por otra parte, para establecer la trazabilidad de la pureza química al sistema internacional de unidades (SI) se requiere, en principio, conocer totalmente la composición del material analizado. En la práctica no es posible tener un conocimiento completo de la composición de un determinado material. Por lo tanto, la trazabilidad de la medida química al SI se establece a partir de sustancias, normalmente de alta pureza, caracterizadas adecuadamente en cuanto a estructura y composición. A pesar del papel tan importante que juegan las sustancias puras, hay muy poca información acerca de cómo evaluar su pureza química, en especial de las sustancias orgánicas con estructuras complejas.¹⁰⁶

A.4.1 Terminología

-Material de referencia (RM)

Sustancia o material del cual una o varias de sus propiedades son suficientemente homogéneas y están bien establecidas para ser usadas en la calibración de un instrumento, en la evaluación de un método de medida o para asignar un valor a un determinado material.¹⁰⁷ En análisis químico los materiales de referencia pueden

encontrarse como sustancia pura, como disolución de una o varias sustancias puras o en una matriz similar a la de las muestras reales.

-Material de referencia certificado (CRM)

Es un material de referencia en el cual una o varias de sus propiedades se han certificado mediante procedimientos que establecen la trazabilidad de ese valor a la unidad apropiada para esa propiedad y en el que además el valor de dicha propiedad viene acompañado de un valor de incertidumbre a un intervalo de confianza dado.

-Pureza química

No existe una definición desde el punto de vista metroológico de la pureza química. La IUPAC tampoco recoge ninguna definición de esta propiedad. Desde un punto de vista práctico, se podría decir que una sustancia es suficientemente pura si las propiedades que se van a medir son representativas del componente principal y si las posibles impurezas presentes que pudieran interferir con el propósito específico del material son lo suficientemente bajas como para que su efecto sea despreciable dentro de un determinado límite de incertidumbre. De esta manera la pureza se define como la cantidad de material de interés relativa a la cantidad total de todas las sustancias presentes. El grado de pureza química aceptable dependerá del uso específico que se le vaya a dar al material en cuestión.

-Trazabilidad

Es la propiedad del valor de una medida o estándar a través de la cual se puede relacionar con referencias establecidas, normalmente estándares internacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones, cada una de las cuales tiene una incertidumbre asociada conocida. En resumen, la trazabilidad es la manera de asegurar que medidas hechas en distintos tiempos, por diferentes analistas y con distintos métodos puedan compararse con fiabilidad. De este modo, si se dispone de un RM adecuado para la medida de una determinada propiedad, la determinación trazable de dicha propiedad es directa, siempre que se utilicen métodos validados en los que se haya evaluado la incertidumbre total de los mismos. Si este RM es un CRM entonces la trazabilidad al estándar de referencia, como por ejemplo el SI, está garantizada, ya que por definición el CRM es trazable a dicho estándar y por tanto la medida calibrada con respecto a dicho CRM también será trazable. Si no se dispone de un RM, para poder

asegurar la trazabilidad habría que comparar la medida con respecto a otra propiedad química o física para la cual sí haya disponibles materiales de referencia.^{108,109}

-Calibración

La calibración engloba una serie de operaciones que relacionan el valor de una determinada cantidad medida mediante un instrumento de medida con el correspondiente valor de un estándar. Mediante el proceso de calibración se establece la trazabilidad de la medida.

-Incertidumbre

Se define como el parámetro asociado con el resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que se pueden atribuir a la magnitud medida.

-Validación de un método

Confirmación y obtención de evidencia objetiva de que un método determinado cumple con los requisitos establecidos para una finalidad en concreto.

-Método primario de análisis

Por definición un método primario de análisis es aquel que posee la más alta calidad metrológica, cuyo fundamento se puede comprender y describir totalmente y cuya incertidumbre global se puede definir en términos del sistema internacional de unidades. Los métodos primarios se pueden dividir en directos, aquellos que proporcionan el valor de una magnitud sin necesidad de un estándar, y relativos, en los que se mide la relación entre el valor desconocido y el valor de un estándar de la misma magnitud y cuyo fundamento debe estar totalmente descrito por una ecuación de medida. Debe de ser un método específico para una sustancia determinada y los valores de todos los parámetros deben ser conocidos o deben poder calcularse, con un determinado valor de incertidumbre asociado.¹⁰⁸ No existe un método de medida que sea primario para todas las aplicaciones si no que existen una serie de métodos generales con el potencial de ser primarios en circunstancias específicas, que deben establecerse claramente, siendo necesaria la validación del método para cada propósito en concreto.

-Componentes de las sustancias químicas puras

Componente principal (CP): es la sustancia o conjunto de sustancias de interés y que serán las más abundantes en la mezcla.

Impurezas (I): cualquier otro componente presente en la mezcla que no sea el principal.

A.4.2 Métodos de análisis de pureza química de sustancias puras

A.4.2.1 Tipos de métodos de análisis de pureza

Por definición la suma de la cantidad o la masa del componente principal más la cantidad o la masa de todas las posibles impurezas es igual a la cantidad total de sustancia o a la masa total en una muestra. Cantidad de sustancia (n_{cp}) y masa del CP (m_{cp}) se relacionan directamente a través de su peso molecular (M_{cp}):

$$m_{CP} = n_{CP} M_{CP} \quad [14]$$

Ecuaciones análogas pueden escribirse para cada una de las impurezas.

La cantidad de sustancia y la masa de sustancia de un componente C cualquiera pueden expresarse como fracción (x_c y w_c respectivamente) de la muestra total:

$$x_C = \frac{n_C}{n_{CP} + \sum_i n_I} \quad [15]$$

$$w_C = \frac{m_C}{m_{CP} + \sum_i m_I} \quad [16]$$

Los valores de estas fracciones no serán iguales a menos que todos los pesos moleculares de todos los componentes sean iguales. Sin embargo, si la cantidad total de impurezas es pequeña en relación a la cantidad de componente principal, ambas magnitudes serán muy similares. Teniendo en cuenta que la suma de fracciones molares y de fracciones en masa es igual a la unidad, es decir:

$$x_{CP} + \sum_i x_I = w_{CP} + \sum_i w_I = 1 \quad [17]$$

si se conocen todas las posibles impurezas, la pureza de un material puro puede determinarse de tres formas distintas: determinación directa de n_{cp} , determinación directa de x_{cp} o w_{cp} o estimación simultánea de $1-\sum x_I$, es decir cuantificando la fracción de impurezas y obteniendo la fracción de CP por diferencia (determinación indirecta).

A.4.2.1.a Determinación directa de la cantidad de componente principal (n_{cp})

A continuación se resumen distintos métodos que permiten determinar la cantidad de CP sin necesidad de cuantificar las distintas impurezas.

1.-Gravimetría

En la práctica más habitual se emplea el método por precipitación, mediante el cual, a una disolución que contiene un analito muy soluble, se le adiciona un agente precipitante, de manera que reaccione selectivamente con dicho analito formando un nuevo compuesto de muy baja solubilidad, cuya masa se determina gravimétricamente mediante una balanza analítica.¹¹⁰ Para poder obtener una determinación precisa se requieren cantidades considerables de analito, de decenas de miligramos hasta gramos, pudiendo alcanzarse incertidumbres menores del 0,1%. La trazabilidad del resultado de las medidas gravimétricas se asegura mediante la calibración correcta de la balanza y el conocimiento de la estequiometría de la especie insoluble generada. La principal desventaja de estos métodos es que en general, las reacciones utilizadas para generar el compuesto insoluble no son específicas y por lo tanto, deben evaluarse las posibles impurezas que puedan interferir, además de aplicar correcciones a las distintas etapas del análisis debido a pérdidas en el proceso de filtración, precipitación incompleta, etc... Por tanto desde un punto de vista práctico los métodos gravimétricos por sí mismos no son los más apropiados para determinar la pureza de sustancias orgánicas, debiendo combinarse con otros métodos instrumentales que permitan evaluar las posibles fuentes de error y realizar las correcciones oportunas.¹¹¹

2.-Volumetría

Se basa en la determinación de la cantidad de un reactivo, denominada valorante, que se requiere para reaccionar con una disolución que contiene una cantidad desconocida del compuesto de interés.¹¹² La estequiometría de la reacción entre analito y reactivo debe estar perfectamente definida. La etapa principal consiste en determinar el punto de equivalencia, en el cual la cantidad de valorante añadida es estequiométricamente equivalente a la cantidad de analito. Normalmente se utiliza algún tipo de sustancia

indicadora que reaccione bien con el valorante o bien con el analito para producir, por ejemplo, un cambio de color una vez que la reacción de valoración se ha completado. También es habitual determinar el punto final mediante medidas instrumentales. Al igual que para la gravimetría, se necesitan cantidades relativamente grandes de muestra y las reacciones utilizadas no son en general totalmente específicas, por lo que es necesario realizar también correcciones apoyándose en métodos instrumentales. La trazabilidad se asegura mediante la calibración adecuada del sistema de medida y mediante la estandarización del valorante. Las incertidumbres en la medida pueden llegar a ser tan bajas como 0,01%.

3.-Resonancia magnética nuclear cuantitativa (q-NMR) con patrón interno

La determinación de pureza de sustancias orgánicas mediante q-NMR¹¹³ se basa en que la señal obtenida en un espectro para el componente principal (I_{cp}) es directamente proporcional al número de núcleos N_{cp} del compuesto que generan dicha respuesta.

$$I_{cp} = k_s N_{cp} \quad [18]$$

En donde k_s es la constante del espectrómetro utilizado. Normalmente una única sustancia genera varias líneas de resonancia específicas, siendo suficiente integrar una de ellas para calcular la pureza. La manera más eficaz de obtener resultados cuantitativos por NMR es medir la relación de la señal del componente principal (I_{cp}) con respecto a la señal de un estándar interno (I_{EI}) de elevada pureza. La inclusión en la muestra de dicho patrón interno adecuado permite la estimación de las cantidades relativas de distintos compuestos en una mezcla. Una vez optimizados los parámetros instrumentales, k_s será la misma para cualquier línea de resonancia dentro de un mismo espectro y, por ello, la relación de señales será igual a la relación de átomos entre el compuesto a determinar y el patrón interno.

$$\frac{I_{cp}}{I_{EI}} = \frac{N_{cp}}{N_{EI}} \quad [19]$$

Por tanto la cuantificación mediante esta técnica puede realizarse simplemente empleando un único patrón genérico que contenga el mismo tipo de núcleo que las especies a analizar, siendo el ^1H el más habitual. La pureza de una sustancia se determina mediante la expresión:

$$P_{cp} = \frac{I_{cp} N_{EI} M_{cp} m_{EI}}{I_{EI} N_{cp} M_{EI} m} P_{EI} \quad [20]$$

En donde M_{cp} y M_{EI} son las masas molares del analito y estándar interno respectivamente, m es la masa de muestra utilizada y m_{EI} y P_{EI} son la masa y la pureza del estándar interno respectivamente. Para poder aplicar este procedimiento debe de garantizarse que la señal analítica utilizada en la cuantificación sea debida exclusivamente a un único grupo funcional o fragmento molecular del analito, sin contribuciones de otro tipo (impurezas), ya que de lo contrario se cometerían errores en la determinación. La cantidad de sustancia necesaria para realizar la determinación va de los pocos miligramos a cientos, pudiendo obtenerse incertidumbres de en torno al 0,5% o incluso menos, en el caso de sustancias muy puras.^{114,115} Los resultados son trazables a la cantidad de materia del estándar interno empleado. Las principales desventajas de la técnica son el elevado coste de la instrumentación y la complejidad en la evaluación de los datos analíticos, que requiere de personal altamente cualificado para la obtención de resultados exactos y precisos en la cuantificación.¹¹³

4.-Análisis por dilución isotópica

El método ya comentado del ajuste exacto sería el más indicado para la determinación directa de pureza en sustancias orgánicas puras, dado que no es necesario que el trazador esté perfectamente caracterizado. Incertidumbres relativas inferiores al 0,1% son típicas empleando esta técnica.

5.-Análisis elemental

El análisis elemental se utiliza frecuentemente para la determinación de los elementos C, H, N, O y S. También es útil para confirmar otro tipo de impurezas como puede ser el agua. Los resultados de la composición elemental pueden verse afectados

por la presencia de impurezas con fórmula química igual o similar a la del componente principal.

6.-Otras técnicas con potencial para la determinación directa de la cantidad de componente principal

La combinación de GC o de LC con CLND (Chemiluminiscent Nitrogen Detector)¹¹⁶ también permitiría la determinación directa de la pureza de sustancias, en este caso nitrogenadas, dado que esta técnica se basa en la conversión cuantitativa de las moléculas que eluyen del sistema cromatográfico en una única especie poliatómica sencilla como es el NO. Los compuestos nitrogenados que eluyen del cromatógrafo se hacen pasar a través de un horno a alta temperatura (1000°C aproximadamente), y en exceso de oxígeno de manera que se produce la combustión completa de los mismos, obteniéndose como resultado distintos productos tales como agua, dióxido de carbono y monóxido de nitrógeno. El NO se hace reaccionar con un exceso de ozono, generándose NO₂ en un estado excitado, el cual es responsable de la emisión de los fotones (quimioluminiscencia) que generan la señal analítica.

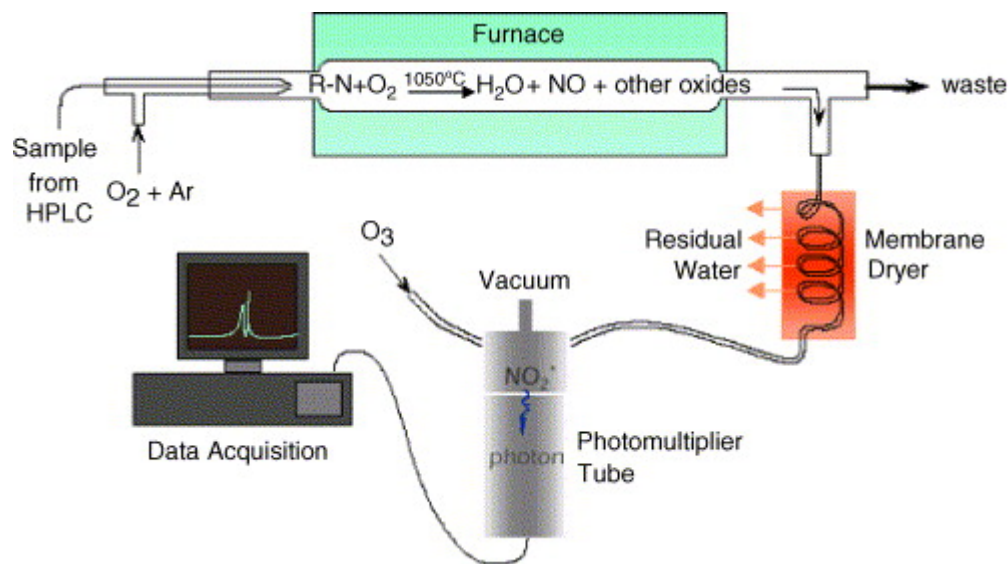


Figura 8. Esquema de la instrumentación utilizada en LC-CLND

Otra técnica con potencial como detector universal en cromatografía, es la denominada CRIMS (Chemical Reaction Interface Mass Spectrometry).^{117,118} En esta técnica, se utiliza un plasma de microondas a baja presión como interfase, cuyo entorno químico puede modificarse mediante la adición de distintos gases reactivos (O_2 , SO_2). Los analitos entran en la cámara del plasma reaccionando con el gas. Los productos resultantes de esta reacción son las especies medidas en el espectrómetro de masas.

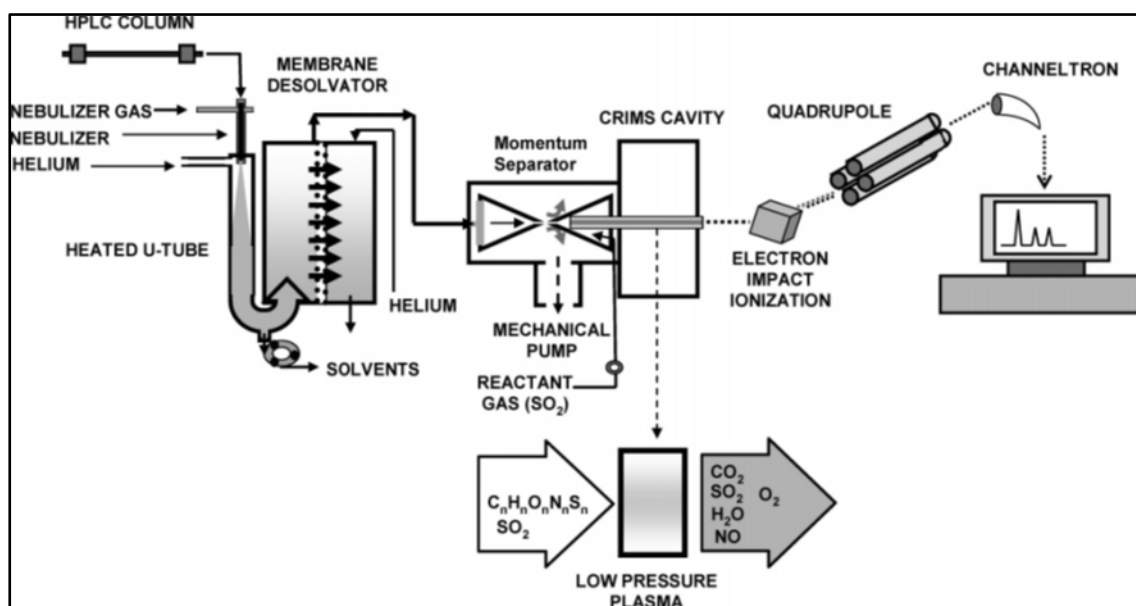


Figura 9. Esquema de la configuración instrumental utilizada en LC-CRIMS¹¹⁸

El acoplamiento de GC o de LC con IRMS (Isotope Ratio Mass Spectrometry),¹¹⁹ también permitiría en principio la determinación directa de la pureza de una sustancia, dado que, al igual que CLND o CRIMS, se basan en la transformación de los compuestos de interés en moléculas poliatómicas sencillas, CO_2 en este caso concreto.

La aplicabilidad a la determinación de purezas de las técnicas mencionadas recae en que podrían calibrarse utilizando un estándar genérico adecuado, dado que la especie finalmente medida es única (CO_2 , NO_2 , etc...), y por tanto la respuesta instrumental sería independiente del compuesto siempre y cuando la oxidación o la combustión fuesen cuantitativas. La trazabilidad se aseguraría mediante dicho estándar. Debe mencionarse que aunque estas técnicas tienen potencial para ser detectores universales de cantidad de compuesto, dado el principio en el que se basan, su eficacia desde un punto de vista cuantitativo, a excepción de CLND, aún no ha sido estudiada en rigor.

A.4.2.1.b Determinación directa de la fracción en masa (w_{cp}) o moles (x_{cp}) del componente principal

Estos métodos se basan en la asunción de que es posible separar todas las posibles impurezas bien en función del tiempo (cromatografía), en función de la frecuencia (RMN), de la masa (MS) o por otros medios físicos y que además, la sensibilidad instrumental para los distintos componentes de la mezcla es similar o idéntica. Si estos dos requisitos se cumplen es posible determinar la fracción en masa o moles del componente principal como la relación entre la señal debida al CP y la suma de las señales de todos los componentes de la mezcla. Varias técnicas se utilizan habitualmente de esta forma para estimaciones de pureza.

1.-Cálculo del porcentaje en área por cromatografía de gases (GC)

La excelente resolución que puede obtenerse mediante GC unido a las buenas prestaciones del FID para compuestos orgánicos en cuanto a intervalo dinámico y sensibilidad, hacen que sea una técnica utilizada ampliamente en la caracterización de CRM's e incluso se ha propuesto, en combinación con otras técnicas, como método primario de análisis idóneo para la certificación de sustancias orgánicas.¹²⁰ Dado que la respuesta del FID es aproximadamente proporcional al número de carbonos de la molécula, si se conoce el tipo de impurezas presentes en el material y estas son estructuralmente similares al componente principal, se podría estimar directamente w_{cp} mediante GC-FID. Sin embargo este detector no es sensible al agua y además su respuesta es sólo aproximadamente proporcional, con lo cual deben utilizarse otras técnicas complementarias durante el proceso de certificación. El resultado de w_{cp} obtenido será trazable siempre que se cumplan las siguientes condiciones:

- la fracción de componente principal es muy grande
- todas las impurezas son detectadas y separadas del componente principal
- los factores de respuesta del FID son similares para el componente principal y todas sus impurezas

Otros sistemas de detección para cromatografía de gases que debido a sus características podrían ser utilizados para este tipo de aplicaciones son IRMS, CRIMS o AED.

2.-Cálculo del porcentaje en área mediante cromatografía líquida (LC)

Aunque en general la resolución que proporciona la cromatografía líquida es netamente inferior a la que se puede obtener por cromatografía de gases, el número de mecanismos de separación existentes y de fases estacionarias disponibles es muy superior y por tanto el potencial para separar los distintos componentes de una mezcla es mayor. Además las temperaturas que se utilizan normalmente en separaciones por HPLC son bajas con lo que no existe riesgo de descomposición térmica. El principal problema de la técnica es que no existe ningún detector que presente una respuesta más o menos constante para todos los compuestos orgánicos. La detección UV-VIS es utilizada habitualmente para la determinación de pureza mediante el cálculo del porcentaje en área, sin embargo la respuesta de este detector puede variar mucho con pequeños cambios en la estructura de los compuestos. IRMS y CRIMS podrían ser sistemas de detección adecuados, aunque aún no se han validado para la determinación de pureza.

3.-Cálculo del porcentaje en área mediante resonancia magnética nuclear (RMN)

Como en los casos anteriores, la pureza se obtiene calculando la relación entre la señal obtenida para la sustancia de interés y la suma de todas las señales del espectro obtenidas para el núcleo medido (normalmente ^1H o ^{13}C). Se necesita al menos una señal del componente principal libre de interferencias. Incertidumbres en la integración de en torno al 0,5% son típicas. Los resultados obtenidos son trazables siempre y cuando:

- el valor x_{pc} sea muy alto
- se integren todas las señales
- las relaciones átomos/molécula se hayan determinado correctamente

-A.4.1.2.c Métodos para la determinación de la fracción molar de impurezas (Σx_i)

Los siguientes métodos permiten determinar el valor Σx_i sin necesidad de identificar previamente las distintas impurezas.

-Métodos térmicos

Son utilizados frecuentemente en la determinación de la pureza de sustancias tanto inorgánicas como orgánicas que contengan niveles de impurezas bajos (<2%). Las principales ventajas que presentan es que no requieren un patrón puro de la sustancia de interés y que permiten obtener buenas precisiones (<0,2%). La determinación de pureza se realiza a partir de la ecuación de Van't Hoff que relaciona la disminución del punto de fusión de una sustancia no pura con la fracción molar de las impurezas que contiene.

$$T = T_0 - \left(\frac{RT_0^2}{\Delta H_{fus}} \right) \frac{x_i}{F} \quad [21]$$

En donde T es la temperatura de fusión del material impuro, T_0 la temperatura de fusión del material puro, ΔH_{fus} la entalpía molar de fusión, R la constante de los gases, F la fracción de sólido fundido a la temperatura T y x_i la fracción molar de las impurezas. F se calcula en cualquier momento del experimento a partir del calor de fusión liberado a esa temperatura. Representando la temperatura observada frente a $1/F$ se obtiene una línea recta a partir de cuya pendiente se puede calcular x_i . Para poder aplicar esta ecuación deben de cumplirse varias premisas:

-el sistema debe de comportarse de manera ideal, es decir, la fracción de impureza debe de ser totalmente soluble en el fundido y no deben formarse soluciones sólidas.

-debe de alcanzarse el equilibrio en el sistema entre el sólido y la fase fundida.

-la fracción de impurezas debe de ser muy pequeña, inferior al 1,5%.

Existen distintas técnicas calorimétricas que se emplean habitualmente en la determinación de pureza.¹²¹ Los primeros análisis realizaron utilizando calorimetría adiabática. Este método es capaz de proporcionar resultados con alta exactitud y precisión pero requiere grandes cantidades de muestra (50-100g), y la medida se prolonga durante varias horas. Aun así se sigue utilizando en la actualidad en centros de metrología como técnica complementaria en la certificación de materiales de referencia de alta pureza.¹²² Hoy en día se emplea mayoritariamente la calorimetría de barrido diferencial (DSC) para este tipo de aplicaciones dado que requiere mucha menor cantidad de muestra, en torno a 5mg dependiendo del tipo de instrumento, y la duración

del análisis es de aproximadamente 1h. Sin embargo para obtener resultados exactos los diferentes parámetros instrumentales (velocidad de calentamiento, encapsulado de la muestra, evaporación de la misma) deben de controlarse muy cuidadosamente. Además en ambas técnicas deben de aplicarse distintos factores de corrección para obtener resultados exactos.¹²¹ Por otra parte los métodos calorimétricos no son aplicables a materiales que se descomponen en las proximidades del punto de fusión ni a aquellos que sufren transformaciones polimórficas durante el análisis. Debido a la complejidad de estas técnicas, para confirmar la exactitud de las medidas es recomendable analizar sustancias de pureza conocida antes de proceder al análisis del material desconocido y validar los resultados mediante otras técnicas. Los resultados serán trazables siempre y cuando las premisas anteriormente citadas se cumplan.

-Análisis por solubilidad de fases

Es un método muy utilizado, junto con la DSC, en la determinación de la pureza de patrones de referencia para el análisis de productos farmacéuticos.¹²³ Se basa en el principio termodinámico de que una disolución saturada no altera su composición con la adición de más sólido a temperatura constante. Sin embargo, si una o varias impurezas están presentes la composición de la disolución va a cambiar hasta que se sature con respecto a cada componente. Para realizar la medida se preparan varios viales sellados en los que se adicionan distintas cantidades de sólido manteniendo constante la cantidad de disolvente y a la misma temperatura para posteriormente, una vez alcanzado completamente el equilibrio, determinar el peso del sólido disuelto. Es un método muy laborioso, cada análisis de pureza puede tardar semanas incluso, que requiere grandes cantidades de muestra (1-100g). Además no es apto para el análisis de mezclas líquidas ni de compuestos que formen suspensiones.

A.5 DETERMINACIÓN DE LA PUREZA EN MASA DE ESTÁNDARES DE PÉPTIDOS

A.5.1 Cuantificación absoluta de proteínas por espectrometría de masas

El estudio de las proteínas en los organismos vivos, proporciona información esencial acerca de múltiples procesos biológicos, permitiendo identificar aquellas proteínas cuya presencia, ausencia o alteración se correlaciona con determinados estadios fisiológicos. El despegue definitivo de esta ciencia se produjo con el desarrollo

y consolidación de la espectrometría de masas aplicada al análisis de biomoléculas, debido a la capacidad de estas técnicas de proporcionar información cualitativa y cuantitativa de cientos de proteínas simultáneamente. Aunque la mayoría de estudios llevados a cabo inicialmente en proteómica se basaban principalmente en la identificación de las proteínas presentes en un determinado sistema biológico, en los últimos años se ha producido un gran incremento en el número de métodos desarrollados para la determinación la cantidad absoluta de proteínas basados en espectrometría de masas, hasta el punto de que la gran mayoría de los experimentos realizados hoy en día se basan en la obtención de información cuantitativa.⁵⁰

A pesar de que es posible determinar proteínas intactas de manera directa, la mayoría de los métodos de cuantificación desarrollados se basan en la ruptura específica de la proteína en fragmentos característicos más pequeños (péptidos), de manera que puedan ser analizados utilizando instrumentación de LC-MS convencional, facilitando la cuantificación. Normalmente ésta se lleva a cabo mediante dilución isotópica utilizando como trazadores péptidos sintéticos marcados isotópicamente, los cuales se adicionan tras la digestión de la proteína. Lógicamente, la exactitud del método dependerá en gran medida de la adecuada caracterización de estos análogos enriquecidos.

Sin embargo, la producción de estándares de péptidos de alta pureza y bien caracterizados en cuanto al grado de hidratación o presencia de impurezas no detectables por espectrometría UV-VIS, tales como sales, es compleja y en muchos casos no es posible. Por este motivo una estimación de la pureza de péptido sintético mediante LC-UVVIS, no reflejará de manera exacta la cantidad real de péptido y por tanto la preparación de una disolución estándar de un patrón así caracterizado no servirá para cuantificar con exactitud.¹²⁴ Un claro ejemplo se encuentra en el material de referencia NIST RM8327, uno de los pocos materiales de referencia de péptidos sintéticos disponibles. Los valores de pureza LC-UVVIS para cada uno de los tres péptidos A, B y C de que consta el material están muy alejados de los valores certificados de pureza en masa, tal y como puede verse en la tabla 1. La cantidad de péptido en un material debe por tanto ser determinada por otros métodos, siendo el análisis de aminoácidos el método de referencia.

Tabla 1. Valores de referencia e incertidumbres expandidas para la pureza UV y la pureza en masa del material de referencia NIST RM8327

Péptido	Absorbancia UV (%)	U ($k=2,776$)	Pureza en masa (%)	U ($k=4,303$)
A	94,0	4,6	69	11
B	86,5	12,6	73	14
C	97,1	3,6	67	16

A.5.2 Análisis de aminoácidos (AAA)

La determinación de los aminoácidos que componen un péptido (o proteína), es decir el análisis de aminoácidos,¹²⁵ es un proceso complejo que consta de dos etapas: una hidrólisis química y la posterior separación cromatográfica, y cuantificación de los aminoácidos liberados. Normalmente los aminoácidos son derivatizados pre- o post-columna y detectados mediante espectrometría visible-ultravioleta o fluorescencia. Una vez cuantificados los aminoácidos, la cantidad de péptido se calcula de manera sencilla, simplemente a través de las relaciones molares.

La hidrólisis es la etapa más crítica del análisis dado que existen diversos factores a controlar tales como temperatura, tiempo de reacción o adición de aditivos, que pueden variar la eficiencia de la reacción. Existen múltiples protocolos de hidrólisis aunque el más aceptado consiste en una hidrólisis ácida en ácido clorhídrico 6M a 110°C durante 24 horas y a vacío o atmósfera inerte. En estas condiciones estándar la digestión es casi completa para la mayoría de péptidos. Sin embargo algunos enlaces peptídicos tales como Ile-Ile, Ile-Val o Val-Val pueden requerir condiciones más fuertes o tiempos de reacción más largos, de hasta 90-120 horas. Además aminoácidos tales como cisteína, metionina, asparragina, glutamina, treonina, serina, triptófano o tirosina, se pueden degradar. Para minimizar las pérdidas de aminoácidos se suelen añadir ciertos aditivos al medio de reacción, típicamente 0,1% de fenol. Desde hace unos años se está popularizando el uso de instrumentos de microondas dado que permiten llegar a la temperatura requerida más rápidamente y además transmiten la energía de forma más eficiente, reduciendo drásticamente el tiempo de reacción.¹²⁶

En cuanto a la detección y cuantificación cada vez se impone con más fuerza el uso de la dilución isotópica,¹²⁷ empleando aminoácidos marcados, dado que permite obtener mejores resultados en términos de exactitud y precisión y además no requiere la derivatización previa de los aminoácidos para poder ser detectados, ya que la detección se hace por espectrometría de masas. Además existen materiales de referencia certificados de aminoácidos que permiten dar trazabilidad a las determinaciones.

A.5.3 Otros métodos para la determinación de la pureza de péptidos

La evidente complejidad del análisis de aminoácidos ha motivado el desarrollo de métodos alternativos que permitan determinar el contenido en péptido de estándares sintéticos de manera más directa y simple.

El acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la detección quimioluminiscente de nitrógeno (CLND) ha sido evaluado para la determinación del contenido de péptido en estándares sintetizados mediante síntesis en fase sólida, utilizando como patrón interno una mezcla estándar de péptidos.¹²⁸ La respuesta de este sistema de detección es proporcional a la cantidad de nitrógeno presente en la molécula y en principio, es capaz de proporcionar información cuantitativa sin la necesidad de utilizar patrones específicos. No obstante, el uso de este detector no se ha popularizado, posiblemente debido a su complejidad instrumental y a su falta de robustez,¹²⁹ y es muy escaso el número de referencias bibliográficas recientes que describen aplicaciones utilizando LC-CLND.

Se han descrito diversas aplicaciones para la cuantificación de péptidos utilizando detección elemental por ICP-MS. Las características de esta técnica, tal y como ya se ha comentado, permiten la cuantificación de compuestos utilizando un único patrón genérico, siempre y cuando estas especies contengan un elemento detectable por ICP. Por tanto, péptidos que contengan en su estructura azufre o fósforo, pueden ser cuantificados directamente.⁶² En caso contrario, es necesaria una etapa de derivatización en la que se introduzca en la molécula una marca que contenga un elemento que sea detectable por ICP-MS.⁶³ El procedimiento de marcaje debe de ser cuantitativo, específico y la estequiometría de la reacción conocida, para poder relacionar la cantidad de elemento determinada por ICP con la cantidad absoluta de péptido.

Existen muy pocas técnicas analíticas que puedan ser utilizadas para determinar de manera directa la pureza de compuestos orgánicos complejos. En el caso concreto de péptidos, el método de referencia, el análisis de aminoácidos, es un proceso complejo con múltiples causas posibles de error, por lo que resulta necesario el desarrollo de nuevos métodos que permitan determinar el contenido de péptido en un estándar de manera más sencilla y trazable, de forma que se dé trazabilidad a las determinaciones de proteínas y se favorezca la generación de resultados comparables entre distintos laboratorios así como el desarrollo de materiales de referencia, hasta ahora muy escasos.

REFERENCIAS

- [1] IUPAC *Compendium of Chemical Terminology*, version 2.3.2 (2012)
- [2] M.J. Cardone, P.J. Palermo, L.B. Sybrandt, *Potential error in single-point-ratio calculations based on linear calibration curves with a significant intercept*, *Analytical Chemistry* 52 (1980), 1187-1191.
- [3] J.J. Thomson, Cathode rays, *Phil Mag (Series 5)* 44 (1897), 293–316.
- [4] K. Wien, *100 years of ion beams: Willey Wien's canal rays*, *Brasilian Journal of Physics* 29 (1999), 401-414.
- [5] J.J. Thomson, *Rays of positive electricity*, *Phil. Mag. (Series 6)* 21 (1911), 225–249.
- [6] J.J. Thomson, *Further experiments in positive rays*, *Phil. Mag. (Series 6)* 24 (1912), 209-253.
- [7] F.W. Aston, *The constitution of atmospheric Neon*
- [8] J.W. Valley, J.R. O'neil, H.P. Taylor, *Theoretical and experimental aspects of isotopic fractionation. In Stable Isotopes in High Temperature Geological Processes*, Jr., eds. Mineralogical Society of America, *Reviews of Mineralogy*, 16 (1986), 1-40.
- [9] K.G. Heumann, *Isotope dilution mass spectrometry of inorganic and organic substances*, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 325 (1986), 661-666.
- [10] G. von Hevesy, F.A. Paneth, *Die Löslichkeit deis Bliesulfides und Bleichromats*, *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* 82 (1913), 323.
- [11] H.H. Ussing, *Analysis of protein by means of deuterium-containing amino-acids*, *Nature* 144 (1939), 977.
- [12] D. Rittenberg, G.L. Foster, *A new procedure for quantitative analysis by isotope-dilution, with the application to the determination of amino acids and fatty acids*, *The Journal of Biological Chemistry* 133 (1940), 737-744.
- [13] R.R. Parrish, S.R. Noble, *Zircon U-Th-Pb geochronology by isotope dilution-thermal ionization mass spectrometry (ID-TIMS)*, *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 53 (2003), 183-213.
- [14] A.P. De Leenheer, L.M. Thienpont, *Applications of isotope dilution-mass spectrometry in clinical chemistry, pharmacokinetics and toxicology*, *Mass Spectrometry Reviews* 11 (1992), 249-307.
- [15] T. Walczyk, *TIMS versus multicollector-ICP-MS: coexistence or struggle for survival?*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (2004), 229-231.
- [16] J. Vogl, *Characterisation of reference materials by Isotope Dilution Mass Spectrometry*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22 (2007), 475-492.
- [17] M.S. Lowenthal, J. Yen, D.M. Bunk, K.W. Phinney, *Certification of NIST standard reference material 2389a, amino acids in 0,1 mol/L HCl-quantification by ID LC-MS/MS*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010), 511-519.
- [18] J. Ruiz Encinar, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Medel, S. Main, P.J. Turner, *A comparison between quadrupole, double focusing and multicollector ICP-MS instruments Part I. Evaluation of total combined uncertainty for lead isotope ratio measurements*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16 (2001), 315-321.
- [19] J. Ruiz Encinar, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Medel, S. Main, P.J. Turner, *A comparison between quadrupole, double focusing and multicollector ICP-MS Part II. Evaluation of total combined uncertainty in the determination of lead in biological matrices by isotope dilution*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 16 (2001), 322-326.
- [20] M.J.T. Milton, T.J. Quinn, *Primary methods for the measurement of amount of substance*, *Metrologia* 38 (2001), 289-296.
- [21] P. Rodríguez-González, J.M. Marchante-Gayón, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Medel, *Isotope Dilution Analysis for elemental speciation: a tutorial review*, *Spectrochimica Acta Part B* 60 (2005), 151-207.

- [22] D.A. Schoeller, *Mass Spectrometry: calculations*. Journal of Clinical Pharmacology 26 (1986), 396-399.
- [23] W.T. Yap, R. Schaffer, H.S. Hertz, V.E. White, M.J. Welch, *On the difference between using linear and non-linear models in bracketing procedures in Isotope Dilution Mass Spectrometry*, Biomedical Mass Spectrometry 10 (1983), 262-264.
- [24] T.L. Teo, C. Quan, P.S. Cheow, T. Huang, T.K. Lee, H. Li, W. Zhang, *A bilateral study for the establishment of comparability in the measurement of ethanol in bioethanol fuel using Isotope Dilution Mass Spectrometry*, Accreditation and Quality Assurance DOI 10.1007/s00769-011-0853-3.
- [25] A. Henrion, *Reduction of systematic errors in quantitative analysis by Isotope-Dilution Mass Spectrometry: an iterative method*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 350 (1994), 657-658.
- [26] L.G. Mackay, C.P. Taylor, R.B. Myors, R. Hearn, B. King, *High accuracy analysis by Isotope Dilution Mass Spectrometry using an iterative exact matching technique*, Accreditation and Quality Assurance 8 (2003), 191-194.
- [27] J. Voegl, W. Pritzkow, *Isotope Dilution Mass Spectrometry-A primary method of measurement and its role for RM certification*, Journal of Metrology Society of India 25 (2010), 135-164.
- [28] T. Catterick, B. Fairman, C. Harrington, *Structured approach to achieving high accuracy measurements with Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Journal of Analytic Atomic Spectrometry 13 (1998), 1009-1013.
- [29] J. Meija, J.A. Caruso, *Deconvolution of isobaric interferences in mass spectra*, Journal of American Society of Mass Spectrometry 15 (2004), 654-658.
- [30] J.A. Rodríguez-Castrillón, L. Hinojosa-Reyes, J.M. Marchante-Gayón, M. Moldovan, J.I.G. Alonso, *Internal correction of spectral interferences and mass bias in ICP-MS, using isotope pattern deconvolution: Application to the determination of selenium in biological samples by isotope dilution analysis*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 23 (2008), 579-582.
- [31] 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 investigation*, Analytical Chemistry 77 (2005), 7724-7734.
- [32] J.F. Pickup, K. McPherson, *Theoretical considerations in stable isotope dilution for organic analysis*, Analytical Chemistry 48 (1976), 1885-1890.
- [33] D. Wade, *Deuterium isotope effects on noncovalent interactions between molecules*, Chemico-Biological Interactions 117 (1999), 191-217.
- [34] A. Mechlinska, L. Wolska, J. Namiesnik, *Isotope-labeled substances in the analysis of persistent organic pollutants in environmental samples*, Trac-Trends in Analytical Chemistry 29 (2010), 820-831.
- [35] E. Ciccimaro, I.A. Blair, *Stable-Isotope dilution LC-MS for quantitative biomarker analysis*. ianalysis 2 (2010), 311-341.
- [36] J.B. Thomas et al, *Preparation and value assignment of standard reference material 968e fat-soluble vitamins, carotenoids, and cholesterol in human serum*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 402 (2012), 749-762.
- [37] S.E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*, Molecular and Cellular Proteomics 1 (2002), 376-386.
- [38] A.N. Kettenbach, J. Rush, S.A. Gerber, *Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptide*, Nature Protocols, 6 (2010), 175-186.
- [39] I.T. Platzner, *Modern Isotope Ratio Mass Spectrometry*, 1ª edición (1999), Capítulo 3, John Wiley & Sons Ltd.
- [40] J.S. Becker, H.J. Dietze, *Inorganic trace analysis by Mass Spectrometry*, Spectrochimica Acta Part B, 53 (1998), 1475-1506.

- [41] K.G. Heumann, *Isotope Dilution Mass Spectrometry*, International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, 118/119 (1992), 575-592.
- [42] T.J. Shaw, T. Duncan, B. Schnetger, *A preconcentration/matrix reduction method for the analysis of rare earth elements in seawater and groundwaters by isotope dilution ICPMS*, Analytical Chemistry 75 (2003), 3396-3403.
- [43] J. Enzweiler, P.J. Potts, K.E. Jarvis, *Determination of platinum, palladium, ruthenium and iridium in geological samples by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry using a sodium peroxide fusion and tellurium coprecipitation*, Analyst 120 (1995), 1391-1396.
- [44] C.B. Zheng, L. Yang, R.E. Sturgeon, X.D. Hou, *UV Photochemical Vapor Generation Sample Introduction for Determination of Ni, Fe, and Se in Biological Tissue by Isotope Dilution ICPMS*, Analytical Chemistry 82 (2010), 3899-3904.
- [45] L. Pei-Ling, H. Kuang-Shie, J. Shiuh-Jen, *Determination of traces of copper, cadmium and lead in biological and environmental samples by flow-injection isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta 284 (1993), 181-188.
- [46] A. Ulrich, C. Moor, H. Vonmont, H.R. Jordi, M. Lory, *Trace element analysis as a forensic tool*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 378 (2004), 1059-1068.
- [47] 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*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 387 (2007), 2453-2461.
- [48] B. Bouyssiere, J. Szpunar, R. Lobinski, *Gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection for speciation analysis*, Spectrochimica Acta Part B 57 (2002), 805-828.
- [49] J. Szpunar, *Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics*, The Analyst 130 (2005), 442-465.
- [50] M. Bantscheff, M. Schirle, G. Sweetman, J. Rick, B. Kuster, *Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 389 (2007), 1017-1031.
- [51] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M.R.F. de la Campa, J. Ruiz Encinar, J. Bettmer, *Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 390 (2008), 3-16.
- [52] J. Bettmer, *Application of isotope dilution ICP-MS techniques to quantitative proteomics*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 397 (2010), 3495-3502.
- [53] L. Rottmann, K.G. Heumann, *Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC-ICPMS for the accurate determination of elemental species*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 350 (1994), 221-227.
- [54] L.L.P. van Stee, U.A.T. Brinkman, *Gas chromatography with atomic emission detection: a powerful technique*, Trends in Analytical Chemistry 21 (2002), 618-626.
- [55] L.L.P. van Stee, U.A.T. Brinkman, *Developments in the application of gas chromatography with atomic emission (plus mass spectrometry) detection*, Journal of Chromatography A 1186 (2008), 109-122.
- [56] I.R. Pereiro, A.C. Díaz, *Speciation of mercury, tin, and lead compounds by gas chromatography with microwave-induced plasma and atomic-emission detection (GC-MIP-AED)*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 372 (2002), 74-90.
- [57] O. Hjelm, H. Borén, G. Öberg, *Analysis of halogenated compounds in coniferous forest soil from a Lepista Nuda (wood blewitt) fairy ring*, Chemosphere 32 (1996), 1719-1728.
- [58] P. Wiwel, K. Knudsen, P. Zeuthen, D. Whitehurst, *Assessing compositional changes of nitrogen compounds during hydrotreating of typical diesel range gas oils using a novel preconcentration technique coupled with gas chromatography and atomic emission detection*, Industrial & Engineering Chemistry Research 39 (2000), 533-540.

- [59] G. Becker, U. Nilsson, A. Colmsjö, Conny Östman, *Determination of polycyclic aromatic sulfur heterocyclic compounds in airborne particulate by gas chromatography with atomic emission and mass spectrometric detection*, Journal of Chromatography A 826 (1998), 57-66.
- [60] I.A. Revelsky, E.S. Chernetsova, A.I. Revelsky, *Gas chromatography with atomic emission detection: a method for the determination of hydrocarbon mixture components*, Mendeleev communications 19 (2009), 233-234.
- [61] A. González-Gago, J.M. Marchante-Gayón, J.I.G. Alonso, *Determination of trihalomethanes in drinking water by GC-ICP-MS using compound independent calibration with internal standard*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 22 (2007), 1138-1144.
- [62] 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*, Angewandte Chemie International Edition 46 (2007), 569-571.
- [63] A. Pereira-Navaza, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, *Capillary HPLC-ICPMS and Tyrosine Iodination for the Absolute Quantification of Peptides Using Generic Standards*, Analytical Chemistry 81 (2009), 5390-5399.
- [64] B. Boyussiere, J. Szpunnar, R. Lobinsky, *Gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection in speciation analysis*, Spectrochimica Acta part B 57 (2002), 805-828.
- [65] A. Solà-Vázquez, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Elemental ratio determinations and compound-independent calibration using microsecond pulsed glow discharge time-of-flight mass spectrometry*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 401 (2011), 2771-2777.
- [66] A. Lásztity, M. Viczián, X. Wang, R.M. Barnes, *Sample analysis by on-line isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 4 (1989), 761-766.
- [67] M. Viczián, A. Lásztity, X. Wang, R.M. Barnes, *On-line isotope dilution and sample dilution by flow injection and inductively coupled plasma mass spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 5 (1990), 125-133.
- [68] H. Klinkenberg, T. Beeren, W. Van Born, *The use of an enriched isotope as an on-line internal standard in inductively coupled plasma mass spectrometry*, Spectrochimica Acta part B 48 (1993), 649-661.
- [69] H. Klinkenberg, W. Van Born, F. Souren, *A theoretical adaptation of the classical isotope dilution technique for practical routine analytical determinations by means of inductively coupled plasma mass spectrometry*, Spectrochimica Acta part B 51 (1996), 139-153.
- [70] A. Dobney, H. Klinkenberg, F. Souren, W. Van Born, *Uncertainty calculation for amount of chemical substance measurements by means of isotope dilution mass spectrometry as a part of the PERM project*, Analytica Chimica Acta 420 (2000), 89-94.
- [71] 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*, Analytical Chemistry 80 (2008), 1952-1961.
- [72] G. Koellensperger, S. Hann, J. Nurmi, T. Prohaska, G. Stingeder, *Uncertainty of species unspecific quantification strategies in hyphenated ICP-MS analysis*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 18 (2003), 1047-1055.
- [73] A. Sarmiento-González, J. Ruiz Encinar, A.M. Cantarero-Roldán, J.M. Marchante-Gayón, A. Sanz-Medel, *HPLC-ICPMS and Stable Isotope-Labeled Approaches To Assess Quantitatively Ti(IV) Uptake by Transferrin in Human Blood Serum*, Analytical Chemistry 80 (2008), 8702-8711.
- [74] J. Goosens, L. Moens, R. Damns, *Determination of lead by flow-injection inductively coupled plasma mass spectrometry comparing several calibration techniques*, Analytica Chimica Acta 293 (1994), 171-181.

- [75] M. Parent, H. Vanhoe, L. Moens, *Evaluation of a flow injection system combined with an inductively coupled plasma mass spectrometer with thermospray nebulization for the determination of trace levels of platinum*, *Analytica Chimica Acta* 300 (1996), 1-10.
- [76] K.G. Heumann, L. Rottmann, J. Vogl, *Elemental speciation with liquid chromatography-inductively coupled plasma isotope dilution mass spectrometry*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 9 (1994), 1351-1355.
- [77] L. Rottmann, K.G. Heumann, *Determination of heavy metal interactions with dissolved organic materials in natural aquatic systems by coupling a high-performance liquid chromatography system with an inductively coupled plasma mass spectrometer*, *Analytical Chemistry* 66 (1994), 3709-3715.
- [78] J. Vogl, K.G. Heumann, *Determination of heavy metal complexes with humic substances by HPLC/ICP-MS coupling using on-line isotope dilution technique*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 359 (1997), 438-441.
- [79] J. Vogl, K.G. Heuman, *Development of an ICP-IDMS method for dissolved organic carbon determinations and its application to chromatographic fractions of heavy metal complexes with humic substances*, *Analytical Chemistry* 70 (1998) 2038-2043.
- [80] C. Sariego-Muñiz, J.M. Marchante-Gayón, J.I. García-Alonso, A. Sanz-Medel, *Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis ICP-MS*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (2003), 1210-1216.
- [81] M.E. del Castillo-Busto, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, *Accurate Determination of Human Serum Transferrin Isoforms: Exploring Metal-Specific Isotope Dilution Analysis as a Quantitative Proteomic Tool*, *Analytical Chemistry* 78 (2006), 8218-8226.
- [82] M.E. del Castillo-Busto, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, *Simultaneous determination of glycosylated haemoglobin, a long term biomarker of diabetes mellitus, and total haemoglobin by isotope dilution and HPLC-ICP-MS*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23 (2008), 758-764.
- [83] M.E. del Castillo, M. Montes-Bayón, E. Añón, A. Sanz-Medel, *Quantitative targeted biomarker assay for glycosylated haemoglobin by multidimensional LC using mass spectrometric detection*, *Journal of Proteomics* 74 (2011), 35-43.
- [84] A. Prange, D. Schaumlöffel, P. Brätter, A. Richarz, C. Wolf, *Species analysis of metallothionein isoforms in human brain cytosols by use of capillary electrophoresis hyphenated to inductively coupled plasma-sector field mass spectrometry*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 371 (2001), 764-774.
- [85] A. Rodríguez-Cea, M.R.F. de la Campa, E. Blanco-González, B. Andón-Fernández, A. Sanz-Medel, *Metal speciation analysis in eel (*Anguilla anguilla*) metallothioneins by anionic exchange-FPLC-isotope dilution-ICP-MS*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 18 (2003), 1356-1364.
- [86] M. Wang, W. Feng, W. Lu, B. Li, B. Wang, M. Zhu, Y. Wang, H. Yuan, Y. Zhuao, Z. Chai, *Quantitative Analysis of Proteins via Sulfur Determination by HPLC Coupled to Isotope Dilution ICPMS with a Hexapole Collision Cell*, *Analytical Chemistry* 79 (2007), 9128-9134.
- [87] N. Zinn, R. Krüger, P. Leonhard, J. Bettmer, *μ LC coupled to ICP-SFMS with post-column isotope dilution analysis of sulfur for absolute protein quantification*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391 (2008), 537-543.
- [88] D. Schaumlöffel, P. Giusti, H. Preud'Homme, J. Spuznar, R. Lobinski, *Precolumn Isotope Dilution Analysis in nanoHPLC-ICPMS for Absolute Quantification of Sulfur-Containing Peptides*, *Analytical Chemistry* 79 (2007), 2859-2868.
- [89] J.G. Martínez-Sierra, F. Moreno-Sanz, P. Herrero-Espilez, R. Santamaría-Fernández, 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 ^{34}S -labelled yeast*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25 (2010), 989-997.
- [90] C. Rappel, D. Schaumlöffel, *The role of sulfur and sulfur isotope dilution in quantitative protein analysis*, *Analytical Chemistry* 390 (2008), 605-615.

- [91] S. Díaz Fernández, N. Sugiyama, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, *Triple quad ICPMS (ICPQQQ), as a new tool for absolute quantitative proteomics and phosphoproteomics*, Analytical Chemistry 84 (2012), 5851-5857.
- [92] I. Gelaude, R. Damns, M. Resano, F. Vanhaecke, L. Moens, *Direct determination of methylmercury and inorganic mercury in biological materials by solid sampling-electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-isotope dilution-mass spectrometry*, Analytical Chemistry 74 (2002), 3833-3842.
- [93] B. Gammelgaard, M.I. Jackson, C. Gabel-Jensen, *Surveying selenium speciation from soils to cell-form and transformations*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 399 (2011), 1743-1763.
- [94] V. Díaz-Huerta, L. Hinojosa-Reyes, J.M. Marchante-Gayón, M.L. Fernández-Sánchez, A. Sanz-Medel, *Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 18 (2003), 1243-1249.
- [95] V. Díaz-Huerta, M.L. Fernández-Sánchez, A. Sanz-Medel, *Qualitative and quantitative speciation analysis of water soluble selenium in three edible wild mushrooms species by liquid chromatography using post-column isotope dilution ICP-MS*, Analytica Chimica Acta 538 (2005), 99-105.
- [96] M. Román, M.L. Fernández-Sánchez, A. Sanz-Medel, H. González-Iglesias, P. Cescon, C. Barbante, *Selenium speciation in rat colon tissues*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 26 (2011), 100-108.
- [97] L. Yu-Feng, H. Liang, L. Bai, et al, *Full quantification of selenium species by RP and AF-ICP-qMS with on-line isotope dilution in serum samples from mercury-exposed people supplemented with selenium-enriched yeast*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 26 (2011), 224-229.
- [98] L. Hinojosa-Reyes, J.M. Marchante-Gayón, J.I. García-Alonso, A. Sanz-Medel, *Quantitative speciation of selenium in human serum by affinity chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis ICP-MS*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 18 (2003), 1210-1216.
- [99] H. González-Iglesias, M.L. Fernández-Sánchez, J.A. Rodríguez-Castrillón, J.I. García-Alonso, J. López-Sastre, A. Sanz-Medel, 24 (2009), 460-468.
- [100] K. Lunøe, J. G. Martínez-Sierra, B. Gammelgaard, J.I. García-Alonso, *Internal correction of spectral interferences and mass bias for selenium metabolism studies using enriched stable isotopes in combination with multiple linear regression*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 402 (2012), 2749-2763.
- [101] S. Hann, G. Koellensperger, Zs. Steřanka, G. Stingeder, M. Fürhacker, W. Buchberger, R.M. Mader, *Application of HPLC-ICP-MS to speciation of cisplatin and its degradation products in water containing different chloride concentrations and in human urine*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 18 (2003), 1391-1395.
- [102] D. García-Sar, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, L.M. Sierra, L. Aguado, M.A. Comendador, G. Koellensperger, S. Hann, A. Sanz-Medel, *Quantitative profiling of in vivo generated cisplatin-DNA adducts using different isotope dilution strategies*, Analytical Chemistry 81 (2009), 9553-9560.
- [103] F. Cluyckens, L.I.L. Balcaen, K. De Wolf, B. de Samber, C. Van Looveren, R. Hurkmans, F. Vanhaecke, *Use of the bromine isotope ratio in HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS analysis of a new drug in development*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 390 (2008), 1717-1729.
- [104] B. Meermann, M. Bockx, A. Laenen, C. Van Looveren, F. Cluyckens, F. Vanhaecke, *Speciation analysis of bromine-containing drug metabolites in feces samples from a human in vivo study by means of HPLC/ICP-MS combined with on-line isotope dilution*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 402 (2012), 439-448.
- [105] Y. Yip, S. Wong, S. Choi, *Assessment of the chemical and enantiomeric purity of organic reference materials*, Trends in Analytical Chemistry 30 (2011), 628-640.

- [106] D.L. Dewer, R.M. Parris, E. White, W.E. May, H. Elbaum, *An approach to the metrologically sound traceable assessment of the chemical purity of organic reference materials*, NIST Special Publication 1012 (2004).
- [107] BIPM/IEC/IFCC/ISO/IUPAC/OIML, *International vocabulary of basic and general terms in metrology*, 2nd Edition (1993).
- [108] T.J. Quinn, *Primary methods of measurement and primary standards*, *Metrologia* 34 (1997), 67-75.
- [109] P. de Bievre, P.D.P Taylor, *Traceability to the SI of amount of substance measurements: from ignoring to realizing, a chemist's view*, *Metrologia* 34 (1997), 67.75.
- [110] C.M. Beck, *Toward a revival of classical analysis*, *Metrologia* 34 (1997), 19-30.
- [111] T.W. Vetter, K.W. Pratt, G.C. Turk, C.M. Beck, T.A. Butler, *Using instrumental techniques to increase the accuracy of the gravimetric determinations of sulfate*, *Analyst* 120 (1995), 2025-2032.
- [112] B. King, *Review of the potential of titrimetry as a primary method*, *Metrologia* 34 (1997), 77-82.
- [113] F. Malz, H. Jancke, *Validation of quantitative NMR*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38 (2005), 813-823.
- [114] M. Weber, C. Hellriegel, A. Rück, R. Sauermoser, J. Wüthrich, *Using high-performance quantitative NMR (HP-qNMR) for certifying traceable and highly accurate purity values of organic reference materials with uncertainties <0.1%*, *Accreditation and Quality Assurance* 18 (2013), 91-98.
- [115] F. Malz, H. Jancke, *Purity assessment problem in quantitative NMR-impurity resonance overlaps with monitor signal multiplets from stereoisomer*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 385 (2006), 760-765.
- [116] E.M. Fujinari, L.O. Courthaudon. *Nitrogen-specific liquid chromatography detector based on chemiluminescence*, *Journal of Chromatography* 592 (1992), 209-214.
- [117] F.P. Abransom, *CRIMS: Chemical reaction interface mass spectrometry*, *Mass Spectrometry Reviews* 13 (1994), 341-356.
- [118] K. Jorabchi, K. Kahen, P. Lecchi, A. Montaser, *Chemical reaction interface mass spectrometry with high efficiency nebulization*, *Analytical Chemistry* 77 (2005), 5402-5406.
- [119] Z. Muccio, G.P. Jackson, *Isotope ratio mass spectrometry*, *Analyst* 134 (2009), 213-222.
- [120] B. King, S. Westwood, *GC-FID as a primary method for establishing purity of organic CRM's used for drugs in sport analysis*, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 370 (2001), 194-199.
- [121] H.F. Ferguson, D.J. Frurip, A.J. Pastor, L.M. Peerey, L.F. Whiting, *A review of analytical applications of calorimetry*, *Thermochimica Acta* 363 (2000), 1-21.
- [122] A. Baldan, R. Bosma, A. Peruzzi, A.M.H. van der Veen, Y. Shimizu, *Adiabatic calorimetry as support to the certification of high purity liquid reference materials*, *International Journal of Thermophysics* 30 (2009), 325-333.
- [123] The United States Pharmacopoeia, USP 29-NF24, Chapter <1171>, 3016.
- [124] W. Burkitt, C. Pritchard, C. Arsene, A. Henrion, D. Bunk, G. O'Connor, *Toward Système International d'Unité-traceable protein quantification: From amino acids to proteins*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 397, 511-519.
- [125] C. Cooper, N. Packer, K. Williams, *Amino acid analysis protocols*. *Methods in molecular biology*, vol. 159.
- [126] C. Pritchard, F.A. Torma, C. Hopley, M. Quaglia, G. O'Connor, *Investigating microwave hydrolysis for the traceable quantification of peptide standards using gas chromatography-mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011, 412, 40-46.

[127] A. Muñoz, R. Kral, H. Schimmel, *Quantification of protein calibrants by amino acid analysis using isotope dilution mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2011, 408, 124-141

[128] E.M. Fujinari, J. Damon Manes, R. Bizanek, *Peptide content determination of crude synthetic peptides by reversed-phase liquid chromatography and nitrogen-specific detection with a chemiluminescent nitrogen detector*. Journal of Chromatography A 1996, 743, 85-89.

[129] D. Corens, M. Carpentier, M. Schroven, L. Meerpoel, *Peptide content determination of crude synthetic peptides by reversed-phase liquid chromatography and nitrogen-specific detection with a chemiluminescent nitrogen detector*. Journal of Chromatography A, 2004, 1056, 67-75.

B.OBJETIVOS

Existe cada vez una mayor necesidad de sistemas de detección que permitan la detección y cuantificación de moléculas orgánicas pequeñas de forma fiable, rápida, precisa y automatizable. Se estima en aproximadamente 14 millones el número de moléculas estables por debajo de 160Da que podrían ser sintetizadas y en 10^{24} la cantidad de compuestos orgánicos distintos que podrían sintetizarse a través de rutas sintéticas conocidas.^{1,2} Evidentemente, resultaría imposible disponer de patrones certificados para todos ellos y por tanto la disponibilidad de un sistema de detección y cuantificación genérico que permitiera obtener resultados cuantitativos sin la necesidad de estándares específicos para cada molécula de interés sería de gran utilidad.

Por otra parte las industrias farmacéuticas a través de sus programas de investigación producen y analizan miles de nuevos compuestos químicos cada año. Antes de que estos compuestos puedan ser utilizados como intermedios sintéticos o en las pruebas biológicas iniciales, debe probarse que son lo suficientemente puros. Durante las etapas inmediatamente posteriores a la síntesis, muchas de las posibles impurezas son desconocidas, no pudiendo determinarse sus factores de respuesta para los detectores habitualmente empleados en HPLC o GC. Por tanto se recurre al cálculo de la pureza mediante porcentaje en área, normalmente mediante UV-VIS, FID, o MS, a sabiendas de que existe un riesgo potencial de que la respuesta para alguna de las impurezas sea sensiblemente distinta de la del compuesto mayoritario. En este aspecto se han estudiado varios tipos de sistemas de detección capaces de generar una respuesta relativamente homogénea e independiente del compuesto, tales como ESLD (Evaporative Light Scattering Detection), CLND (chemiluminiscent nitrogen detector) o RMN, como posibles detectores universales para HPLC.³ Sin embargo, sólo el acoplamiento de RMN con HPLC podría cumplir la función de detector universal y

[1] T. Fink, H. Bruggesser, J.L. Reymond, *Virtual exploration of the small-molecule chemical universe below 160 Daltons*, *Angewandte Chem International Edition* 44 (2005), 1504-1508

[2] P. Ertl, *Cheminformatics analysis of organic substituents: identification of the most common substituents, calculation of substituents properties and automatic identification of drug-like bioisosteric groups*, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 43 (2002), 374-378.

[3] S. Lane, B. Boughtflower, I. Mutton, C. Pterson, D. Ferrant, N. Taylor, Z. Blaxill, C. Carmody, P. Borman, *Towards single-calibrant quantification in HPLC. A comparison of three detection strategies:ELSD, CLNDI and NMR*, *Analytical Chemistry* 77 (2005), 4354-4365.

cuantitativo teniendo como inconvenientes el elevado precio de la instrumentación y su relativamente baja sensibilidad.

Además, un detector sensible y que proporcione una respuesta universal a la masa de compuesto facilitaría enormemente el desarrollo de métodos directos de evaluación de la pureza de nuevos materiales de referencia orgánicos.⁴ Sistemas de detección con estas cualidades serían también de gran ayuda en el estudio y optimización de etapas de preparación de muestra tales como extracción o pre-concentración dado que permitirían evaluar las recuperaciones de forma directa.

La cuantificación mediante dilución isotópica en línea permite obtener resultados cuantitativos sin necesidad de utilizar estándares específicos para cada analito, sin embargo un requisito imprescindible para su aplicación es que la respuesta instrumental sea independiente de la especie a analizar. Por ello sólo se han desarrollado aplicaciones utilizando ICP como fuente de ionización, estando su campo de aplicación restringido a especies que contengan algún elemento detectable por ICP. Otras fuentes de ionización empleadas habitualmente tales como EI o ESI, presentan una respuesta variable en función del analito y por tanto no permiten la aplicación de la dilución isotópica en línea.

Por todo lo mencionado anteriormente, el objetivo principal planteado en la presente tesis doctoral es ***el desarrollo de nuevas metodologías cuantitativas basadas en dilución isotópica en línea de carbono que permitan extender su campo de aplicación a todo tipo de moléculas orgánicas y que puedan ejercer como sistemas de detección genéricos en cromatografía.*** Este objetivo principal se desarrolló a través de los siguientes objetivos específicos:

[4] D.L. Duewer, R.M. Parris, E. White, W.E. May, H. Elbaum, *An approach to the metrologically sound traceable assessment of the chemical purity of organic reference materials*, NIST special publication 1012 (2004).

- **Desarrollo y evaluación de un sistema de cuantificación universal de compuestos orgánicos volátiles basado en cromatografía de gases-combustión-espectrometría de masas y dilución isotópica post-columna de ^{13}C .** Se diseñaron e implementaron, sobre un equipo GC-MS comercial, una serie de modificaciones que permitieron realizar medidas cuantitativas mediante dilución isotópica en línea utilizando un espectrómetro de masas con fuente de ionización molecular (EI), utilizando un único patrón genérico para cuantificar distintas familias de compuestos orgánicos. Como trazador post-columna enriquecido se utilizó $^{13}\text{CO}_2$ disuelto en helio.
- **Evaluación cuantitativa de la micro-extracción en fase sólida como técnica de pre-concentración e introducción de muestra en cromatografía de gases.** Se empleó la instrumentación desarrollada para evaluar de forma cuantitativa, y sin recurrir a la preparación de rectas de calibración, las recuperaciones de distintos tipos de fibras comerciales comúnmente empleadas en microextracción en fase sólida, utilizando como analitos modelo los BTEX. Así mismo se evaluaron las recuperaciones para estos compuestos en aguas de río adicionadas.
- **Desarrollo y validación de un sistema FIA para la medida de CO_2 en disolución acuosa mediante dilución isotópica en línea de ^{13}C .** Se desarrolló un sencillo sistema FIA para la cuantificación de CO_2 disuelto en agua, el cual se generaba inyectando disoluciones de estándares de carbonato o bicarbonato. El sistema se validó mediante el análisis de un CRM de agua de mar certificada en carbono inorgánico disuelto (DIC).
- **Desarrollo de un sistema de cuantificación genérico de compuestos orgánicos solubles en agua, basado en FIA/HPLC-oxidación-MS y dilución isotópica en línea de ^{13}C .** Se utilizó un instrumento comercial de LC-IRMS que consta de una interfase que permite la oxidación en línea de compuestos orgánicos. Se evaluó cuantitativamente su capacidad para oxidar de forma completa distintos tipos de compuestos orgánicos (aminoácidos, azúcares, metabolitos) y se aplicó a la cuantificación de distintas sustancias puras y mezclas sencillas de patrones mediante FIA o acoplando cromatografía líquida.

La metodología se validó en primer lugar para la determinación de pureza de compuestos orgánicos polares de baja complejidad estructural mediante la participación en el estudio de intercomparación P117-c, “Evaluación de la pureza de l-Valina” organizado por el CCQM (Comité Consultatif pour la Quantité de Matière). Posteriormente se demostró y validó su uso potencial para la determinación directa de la pureza en masa de estándares de péptidos mediante el análisis de distintos péptidos sintéticos comparando con resultados obtenidos por distintas técnicas (AAA, ICPMS), y la medida del material de referencia NIST RM8327.

C. EXPERIMENTAL

C.1 DESARROLLO DE UN SISTEMA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES-COMBUSTIÓN-MASAS Y DILUCIÓN ISOTÓPICA POST-COLUMNA DE CARBONO

El sistema se instaló sobre un GC-MS comercial (Konik-Tech, Barcelona, España) consistente en un cromatógrafo de gases con inyector split/splitless y un espectrómetro de masas de tipo cuadrupolo. Tal y como se comentó en la introducción, un requisito imprescindible para poder realizar análisis cuantitativo por dilución isotópica en línea, es disponer de un instrumento capaz de proporcionar una respuesta independiente de la especie a determinar. Los instrumentos comerciales de GC-MS, equipados normalmente con fuentes de ionización electrónica, proporcionan una respuesta específica y por tanto, variable en función de la especie química a analizar. Por ello, para desarrollar una metodología de cuantificación por dilución isotópica en línea empleando esta instrumentación, fue necesario realizar algunas modificaciones sobre el equipo. La figura 10 muestra un esquema del montaje instrumental, mostrando las distintas partes del sistema, las cuales se detallan a continuación.

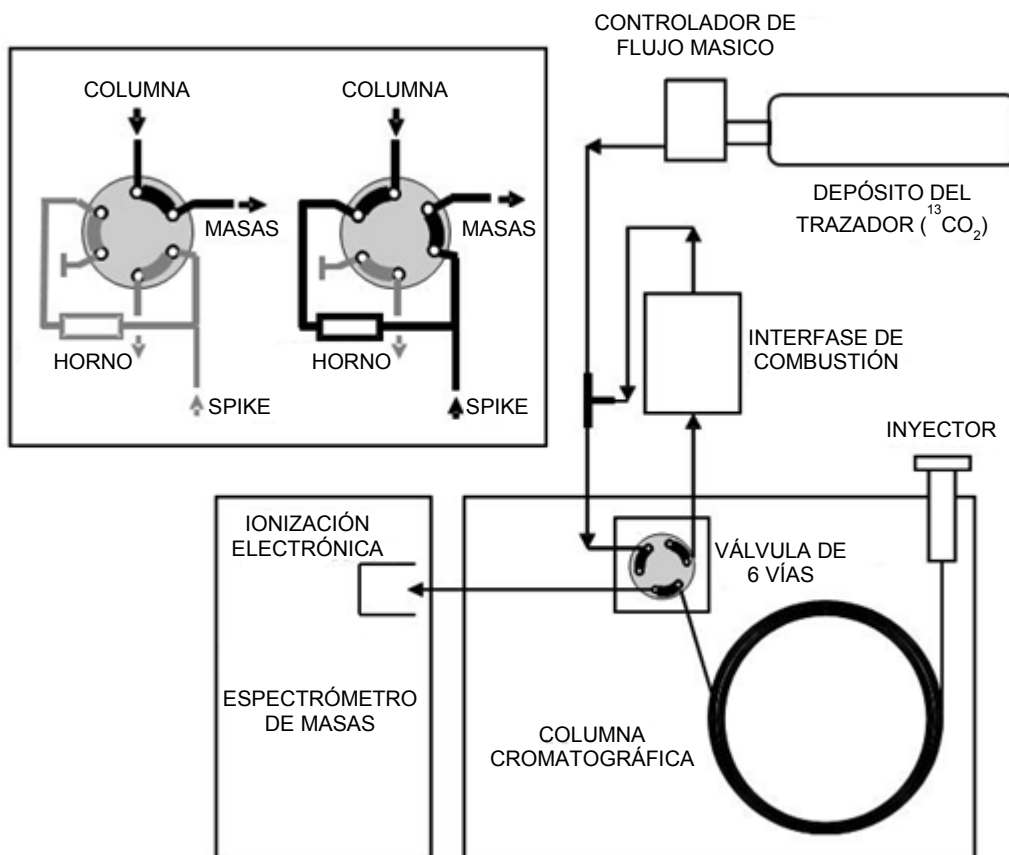


Figura 10. Esquema de las modificaciones realizadas sobre el instrumento GC-MS convencional

C.1.1 Interfase de combustión

La interfase de combustión es la pieza clave del desarrollo instrumental. Permite la conversión cuantitativa a CO_2 de los distintos compuestos orgánicos que eluyen del cromatógrafo de gases. Por tanto, en este paso se consigue una respuesta instrumental homogénea para los distintos analitos, dado que la única especie química que finalmente se detecta es CO_2 . La intensidad de la señal para cada analito dependerá de su concentración y del número de carbonos que posea, pero no de su estructura química. Si como trazador se emplea esa misma especie pero enriquecida en ^{13}C , se obtiene una respuesta instrumental homogénea tanto para los diferentes compuestos de interés como para el trazador, y por tanto es ya posible cuantificar mediante dilución isotópica en línea utilizando un instrumento con fuente de impacto electrónico.

Consta de un tubo cerámico (Elemental microanalysis, Devon, Reino Unido), de 40 cm x 3 mm de diámetro interno y 0,5 mm de espesor, relleno en su parte central con hilos de cobre y platino. Alrededor del tubo va arrollada una resistencia encargada de calentarlo a altas temperaturas. El conjunto se encuentra convenientemente aislado. La temperatura se regula por medio de un controlador externo.

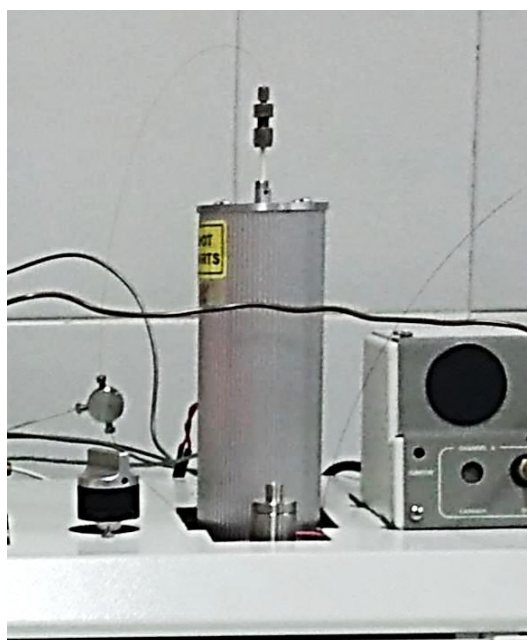
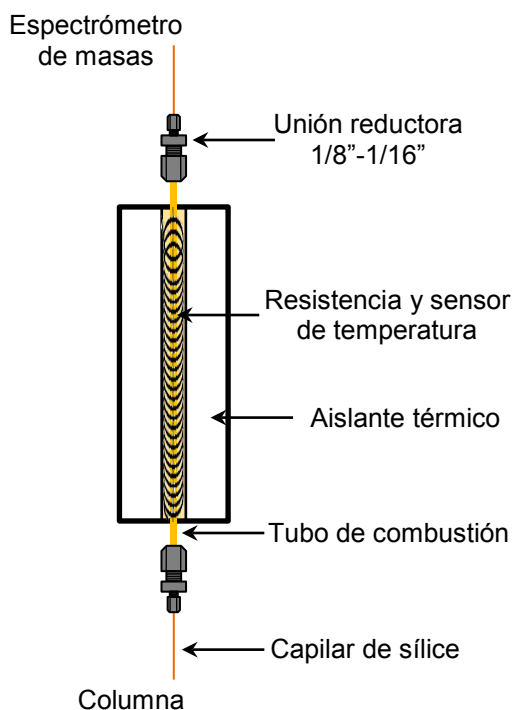


Figura 11. Interfase de combustión para la conversión cuantitativa a CO_2 de especies orgánicas

Para que tenga lugar la reacción de oxidación, el relleno de cobre del tubo de combustión debe ser oxidado previamente a óxido de cobre. Para ello se hace pasar a través del tubo un flujo de aproximadamente 1 mL/min de oxígeno durante 4 ó 5 horas manteniendo la interfase a una temperatura de 500°C. El óxido de cobre actúa como donador de oxígeno en la reacción de combustión, mientras que el platino actúa como catalizador de la misma. Para una conversión cuantitativa a CO₂ de los analitos que eluyan de la columna, la interfase debe de calentarse al menos a 800°C. Como consecuencia de la reacción de oxidación, el óxido de cobre se reduce a cobre elemental con lo que debe re-oxidarse periódicamente.

C.1.2 Sistema de adición post-columna de un flujo de ¹³CO₂ disuelto en helio

Para poder adicionar un flujo gaseoso de un trazador enriquecido, se diseñó un sistema consistente en un cilindro de acero inoxidable de 3,8 L de capacidad (HOKE, Spartanburg, USA) equipado con un manómetro, válvulas de regulación y cierre y una T con septum para la introducción del trazador. Para obtener un flujo constante y conocido del trazador, a la salida del cilindro se acopló un controlador de flujo másico de gas por efecto térmico (Bronkhorst Hi-tech, Ruurlo, Holanda) calibrado para helio, capaz de regular flujos de 0,1 a 5 mL/min con una precisión de ± 0,2%. La mezcla del flujo de trazador con el flujo procedente de la cámara de combustión se realizó mediante un conector “Y” de acero inoxidable (0,25 mm de diámetro interno) VICI (Valco Instruments Company Inc., Houston, USA).

El dióxido de carbono enriquecido se genera a partir de bicarbonato sódico enriquecido comercial (Cambridge Isotope Laboratories, Massachusetts, USA), de pureza mayor del 98%, y con un 99% de enriquecimiento isotópico. Se introducen 200 mg de carbonato enriquecido en un matraz de 3 bocas previamente purgado con helio para evitar contaminaciones por el CO₂ natural presente en el aire. A continuación se introducen unos 500 µL de ácido fosfórico a través de un septum mediante una jeringa (Figura 12A), produciéndose la consiguiente reacción ácido-base en la que se desprende CO₂, en este caso enriquecido en ¹³C (Figura 12B). Utilizando una jeringa especial para gases, se extraen del matraz unos 4 mL de la fase gaseosa (Figura 12C), los cuales se introducen en un cilindro para gases a través de un conjunto válvula-septum diseñado a tal efecto (Figura 12D). A continuación el cilindro se presuriza a 5 bar con helio.

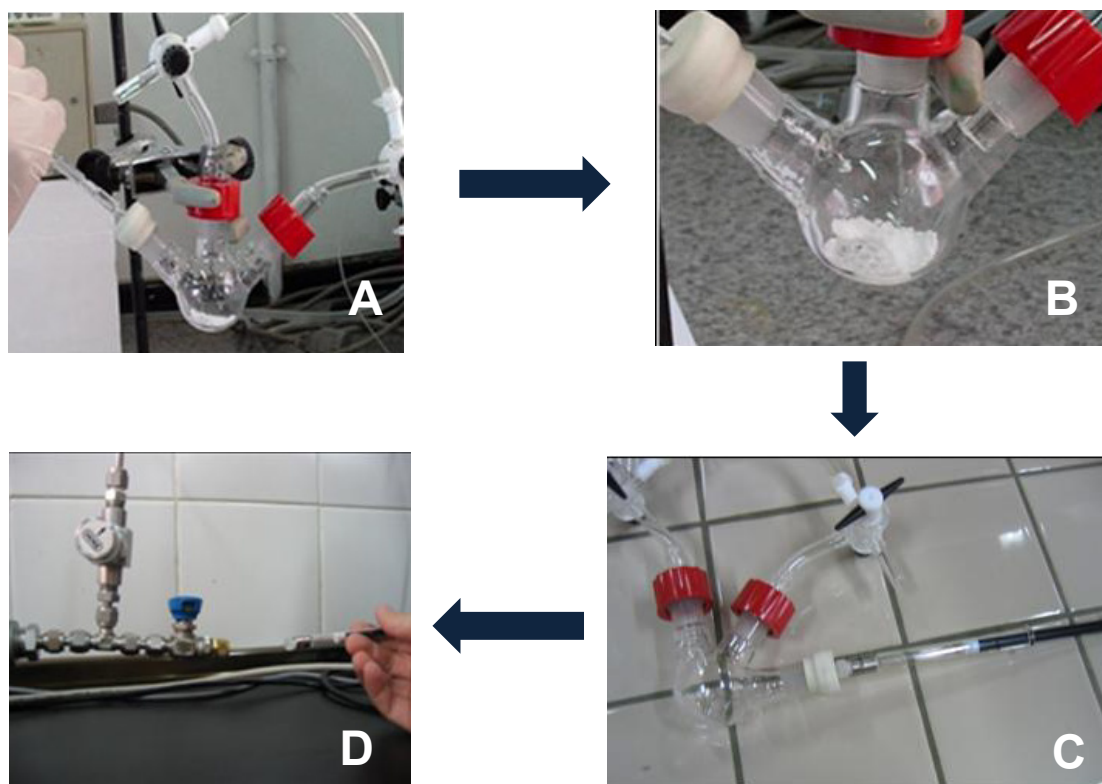


Figura 12. Procedimiento para la generación del CO₂ enriquecido.

C.1.3 Válvula de 6 vías

La última de las modificaciones realizadas, consistió en la introducción en el sistema de una válvula manual para gases de dos posiciones y seis vías fabricada en acero inoxidable, capaz de trabajar a temperaturas de hasta 350 °C (VICI, Houston, USA). Fue instalada en la parte superior del interior del horno cromatográfico (ver Figura 13), y se conectó mediante un brazo metálico a un conmutador manual situado en el exterior del cromatógrafo. Cumple dos funciones principales. Por un lado, la válvula sirve para evitar que el disolvente de la muestra inyectada llegue a la interfase de combustión, lo cual reduciría la vida útil de la misma. Por otro, la válvula permite dirigir el flujo proveniente de la columna bien hacia el espectrómetro de masas directamente o bien hacia la interfase de combustión (ver ampliación Figura 10). En el primer caso, el sistema actúa como un gases-masas convencional, es decir, los analitos previamente separados en el cromatógrafo de gases llegan directamente a la fuente de ionización, lo cual permite su identificación según el espectro de masas de los distintos fragmentos formados. En el segundo caso, los distintos compuestos de interés son transformados cuantitativamente a CO₂ y posteriormente se mezclan con el flujo de ¹³CO₂ como paso

previo a la medida de la relación isotópica 44/45 en el espectrómetro de masas y a su cuantificación.

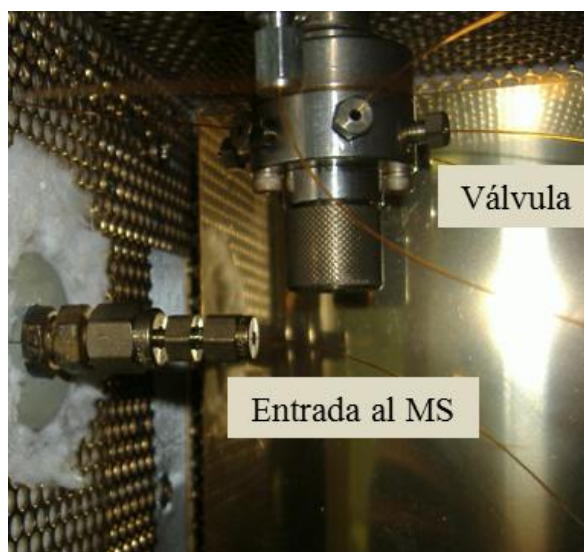


Figura 13. Válvula de 6 vías instalada en el interior del cromatógrafo de gases

C2. DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBONO INORGÁNICO TOTAL EN AGUAS MEDIANTE DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA DE ^{13}C

Una vez desarrollado y optimizado el sistema de cuantificación para sustancias volátiles y estables térmicamente, el siguiente paso consistió en la creación de un sistema análogo que permitiera la determinación de sustancias en disolución acuosa, basado en el mismo principio, la conversión cuantitativa a CO_2 de los analitos, en este caso mediante oxidación química por vía húmeda. El primer paso consistió en validar la detección de CO_2 disuelto en agua mediante dilución isotópica en línea con patrón interno. Para ello se construyó un sistema FIA que permitiera la generación de CO_2 en disolución de manera sencilla y su posterior separación de la fase acuosa para poder detectarlo mediante espectrometría de masas. Como estándar se utilizó carbonato sódico dado que su conversión en CO_2 es muy simple mediante la acidificación de la fase móvil. Como trazador se utilizó el bicarbonato enriquecido comercial empleado anteriormente para generar el CO_2 enriquecido. En la figura 14 puede verse el sistema FIA desarrollado.

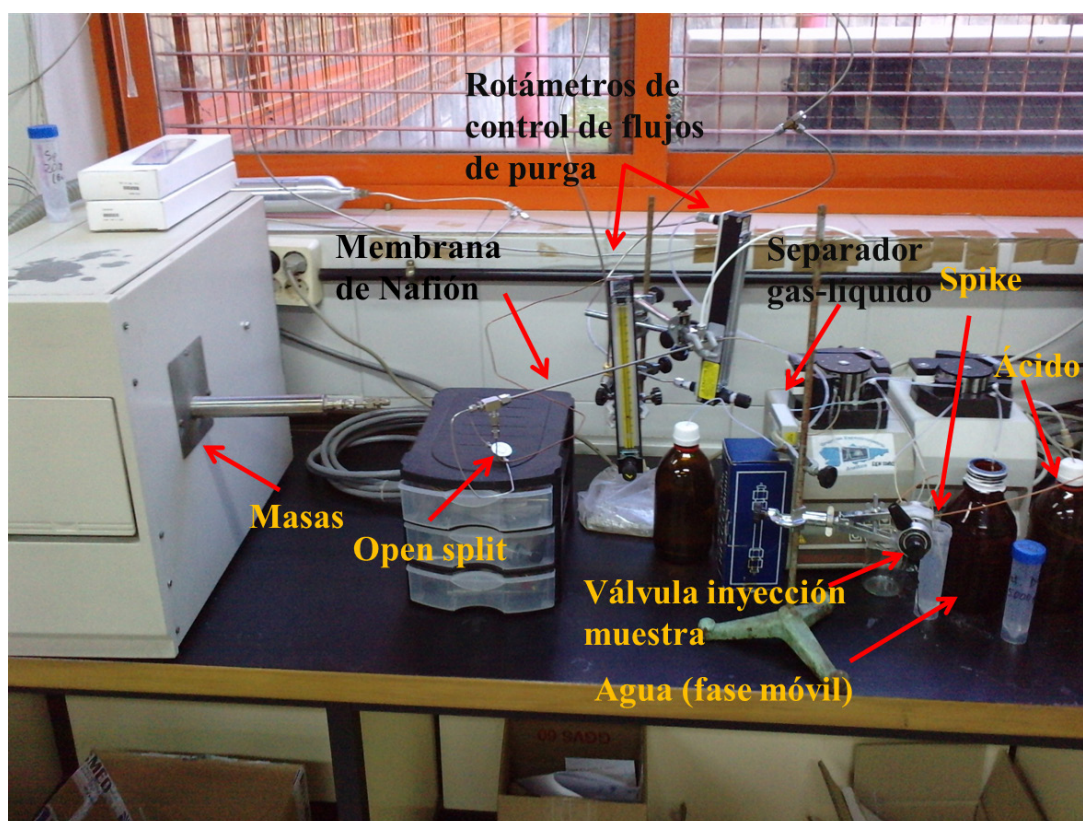


Figura 14. Sistema de análisis por inyección en flujo utilizado para validar la cuantificación de CO₂ en disolución acuosa.

El sistema incluye dos bombas peristálticas para impulsar la fase móvil (agua ultrapura), así como los flujos de spike y de ácido fosfórico requerido para la generación del CO₂. Los estándares de carbonato se inyectan mediante una válvula de 6 vías, y a continuación se mezclan en línea sucesivamente con el spike de bicarbonato y con el flujo de ácido fosfórico, mediante dos conexiones en “T” acopladas en línea, generándose en disolución CO₂ y ¹³CO₂ provenientes de la muestra y del trazador respectivamente. Para extraer el CO₂ de la fase acuosa se emplea un dispositivo de eliminación de carbonato (CRD 300, Dionex, California, USA). Este dispositivo está formado por una membrana tubular permeable a gases de pequeño volumen interno (225 μL), y que tiene un recubrimiento de silicona que la hace selectiva al CO₂. El CO₂ disuelto pasa a través de dicha membrana y es arrastrado por un flujo a contracorriente de 10 mL/min de He que circula por su parte externa. Seguidamente este flujo de CO₂ en He, se hace pasar a través de una membrana de nafión (Permapure, Nueva York, USA), para eliminar la humedad antes de su introducción al espectrómetro de masas. La entrada al espectrómetro de masas consiste en un “open-split” para reducir el flujo de

entrada a la fuente de ionización electrónica a aproximadamente 1mL/min. Para la medida de la relación isotópica, se empleó un espectrómetro de tipo cuádruplo con (MD800, Fisons Instruments). La metodología se validó mediante el análisis de un material de referencia certificado consistente en un agua de mar certificada en carbono inorgánico disuelto (proporcionado por Andrew Dickson, Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego).

C.3 SISTEMA DE CUANTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS ORGÁNICAS SOLUBLES EN AGUA MEDIANTE DILUCIÓN ISOTÓPICA POST-COLUMNA DE CARBONO

Tras la validación de la detección y cuantificación de CO_2 en disolución, se procedió a la evaluación del método de cuantificación de compuestos orgánicos polares. En este caso para la conversión de las distintas especies a CO_2 se utilizó la reacción de oxidación del persulfato sódico en medio ácido. La instrumentación utilizada consistió en un equipo LC-IRMS (Thermo Scientific, Bremen, Alemania), que consta de un cromatógrafo de líquidos (Accella 600 pump) acoplado a un espectrómetro de masas de sector magnético (Delta V Advantage) a través de una interfase diseñada para oxidar cuantitativamente los compuestos orgánicos que eluyen de la columna (LC-Isolink, ver Figura 15).

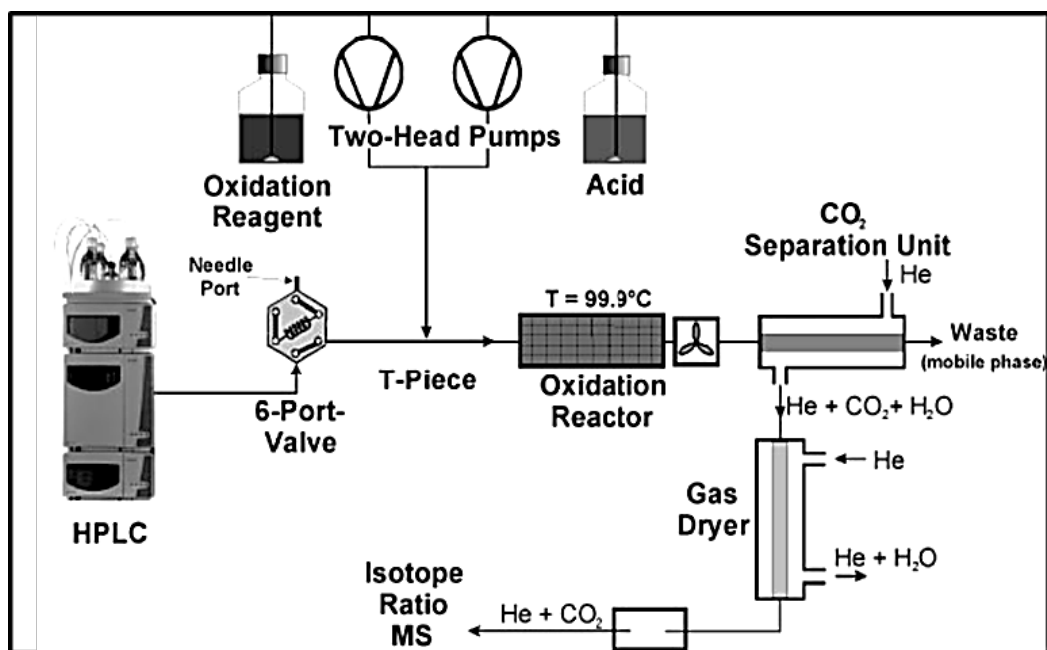


Figura 15. Esquema de la interfase de oxidación utilizada en LC-IRMS

En dicha interfase, el flujo procedente de la columna analítica, se mezcla en línea con los reactivos de oxidación, persulfato sódico 0,3M y ácido fosfórico 1,5M, y pasa a través del reactor, el cual está calentado a 99,9°C, produciéndose la oxidación de los analitos orgánicos a CO₂. A continuación este CO₂ se separa de la fase acuosa mediante una membrana permeable a gases, a través de la cual pasan las moléculas de CO₂, que son arrastradas mediante un flujo de He. Finalmente, antes de llegar al espectrómetro de masas, el flujo de He que contiene el CO₂ se hace pasar a través de una membrana de nafión para eliminar el agua, la cual interferiría en la medida de la señal. Un exceso de agua en la fuente de ionización provocaría una formación excesiva del ion HCO₂⁺, con relación m/z 45, afectando a la exactitud de la relación isotópica medida. La adición del flujo de spike se realiza mediante un conector de peek y una bomba de media presión de alta precisión (P-500 high precision pump, GE Healthcare, Reino Unido). El espectrómetro de masas está especialmente diseñado para la medida de relaciones isotópicas de elementos ligeros. Consta de una fuente de ionización electrónica, de un analizador de masas de sector magnético, y de tres copas de Faraday (numeradas como 3, 4 y 5) para la medida de las señales correspondientes a los iones ¹²C¹⁶O¹⁶O⁺, ¹³C¹⁶O¹⁶O⁺ + ¹²C¹⁷O¹⁶O y ¹²C¹⁸O¹⁶O⁺, con relaciones m/z 44, 45 y 46 respectivamente. Dichas copas llevan distinta amplificación para que las señales de los tres iones sean del mismo orden y poder así medir relaciones isotópicas naturales con altísima precisión. Para poder trabajar con dilución isotópica, es decir, midiendo relaciones isotópicas alteradas, fue necesario modificar la amplificación de la copa 3, donde se registra la señal a m/z 45, para que tuviera la misma señal de salida que la copa número 2, dado que las abundancias naturales se alteran completamente por la adición del trazador. En la Figura 16 puede verse una fotografía de la instrumentación completa que se utilizó.

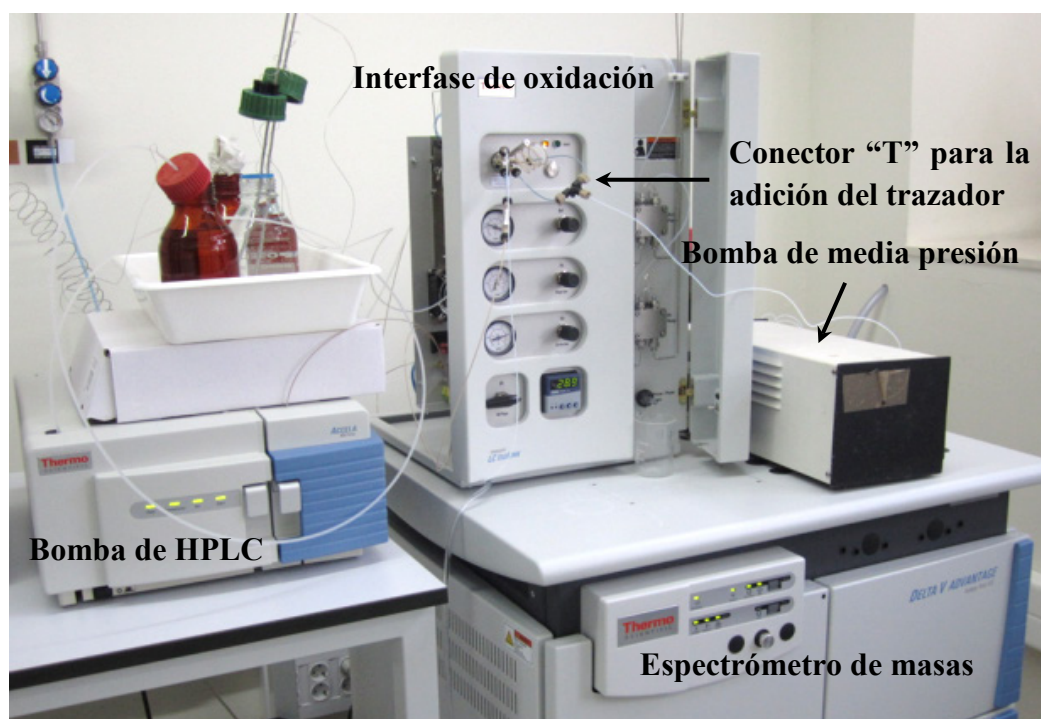


Figura 16. Instrumentación utilizada para la cuantificación de compuestos orgánicos mediante dilución isotópica en línea de carbono

D. RESULTADOS

D.1. DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE CUANTIFICACIÓN GENÉRICO DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN CROMATOGRAFÍA DE GASES BASADO EN DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA DE ^{13}C

D.1.1 Desarrollo inicial y prueba de concepto

D.1.1.1 Artículo científico I: Angew. Chem. Int. Ed.2009, 48, 2561-2564

“A quantitative universal detection system for organic compounds in gas chromatography with isotopically enriched CO_2 ”

***Autores:** Sergio Cueto Díaz, Jorge Ruiz Encinar, Alfredo Sanz Medel, José Ignacio García Alonso*

A Quantitative Universal Detection System for Organic Compounds in Gas Chromatography with Isotopically Enriched $^{13}\text{C}\text{O}_2^{**}$

Sergio Cueto Díaz, Jorge Ruiz Encinar,* Alfredo Sanz-Medel, and J. Ignacio García Alonso*

The search for a truly quantitative standardless and universal chromatographic detector has been a long story of success and failure.^[1] The classic example is the flame ionization detector (FID) in gas chromatography: This universal detector for organic compounds still requires specific calibration, as its response for carbon is not truly compound-independent.^[2] A recent success was the application of inductively coupled plasma (ICP) mass spectrometry (MS). ICPMS has been demonstrated to possess some crucial characteristics of a quantitative universal detector. In particular, the ionization degree for a given element can be made compound-independent, in both liquid^[3,4] and gas chromatography,^[5] to provide a generic quantitative approach without the need to use analytical standards for each compound.^[3,5] This capability has been boosted by the postcolumn use of enriched stable isotopes to quantify unknown compounds or compounds for which standards were not available.^[6] The only requisite to be fulfilled is isotopic equilibration between the different compounds containing the element under study that are eluted from the column and the continuously added isotopically labeled element. Postcolumn isotope dilution analysis has mostly been applied to ICP-detectable elements (trace-metal speciation).^[7] However, there are only two reports so far of the use of ICPMS and the postcolumn (HPLC) addition of ^{13}C -labeled species (benzoic acid^[8] and methanol^[9]) for the quantification of organic compounds. Clearly, the extremely low ionization yield of carbon in the plasma and the high carbon background under normal ICP operating conditions (atmospheric pressure) seriously hamper the use of this ionization source for the detection of carbon-isotope ratios. Moreover, the main problem of ICPMS in particular and most universal quantitative detectors in general is that structural information is lost during the detection process.

GC–MS with electron ionization (EI) has become one of the most widely used techniques in laboratories all over the


world. The coupling of a gas chromatograph with a mass spectrometer detector allows both structural determination and the quantification of any volatile or semivolatile compound (directly or after chemical derivatization) in a wide variety of samples. Of course, as EI is a molecular-ion source, its response is structure-specific for each single molecule to be analyzed.^[10] Therefore, analytical standards for every analyte are needed for time-consuming external calibrations or standard additions if quantification is sought. Isotopically labeled compounds have also been widely used as ideal specific internal standards for very accurate quantitative GC–MS analysis.^[11] Again, as a labeled standard for each analyte in a mixture should be used, this approach can be very expensive when many analytes need to be quantified. The rapid development of the pharmaceutical and pesticide industries, among others, has led to an exponential growth in the number organic compounds subjected to analysis by GC–MS and for which certified analytical standards are not always available. In this sense, the development of a truly universal and accurate quantitative detection technique with which the concentration of many chemical compounds can be determined without the need for specific analytical standards and time-consuming calibration procedures is still required.^[11] This universal quantitative detection technique should also be able to provide structural information on the compounds eluted from the chromatographic column.

Herein, we present the use of postcolumn carbon-isotope dilution in combination with GC–combustion–EIMS. This patented innovative instrumental approach provides the first generic quantitative approach for every organic compound without the need for specific standards. The combustion reaction ensures quantitative conversion of every organic compound eluted from the GC column into CO_2 to provide the required isotopic equilibrium between these compounds and the isotopically enriched carbon tracer ($^{13}\text{C}\text{O}_2$) that is continuously added, prior to their combined exposure to the ionization source. Thus, compound-independent ionization is possible whatever ionization source is used. We selected EI for our experiments so that ionization could be carried out under a high vacuum to enable much higher sensitivity and lower carbon contamination. Additionally, this ionization source can provide structural information when the combustion oven is bypassed. The proof of concept and potential of this universal method for the quantification of organic compounds is demonstrated herein.

The isotopically labeled C species selected was CO_2 enriched in ^{13}C . It was prepared from Na_2CO_3 (^{13}C , 99%) and placed in a 5 L gas container pressurized to 6 atm with He. The output of the container was connected to a mass-flow controller that exactly regulated the flow of the $^{13}\text{C}\text{O}_2$ added

[*] S. Cueto Díaz, Dr. J. Ruiz Encinar, Prof. Dr. A. Sanz-Medel, Prof. Dr. J. I. García Alonso
Department of Physical and Analytical Chemistry
University of Oviedo
Julián Clavería 8, 33006 Oviedo (Spain)
Fax: (+34) 98-510-3125
E-mail: ruizjorge@uniovi.es
jjga@uniovi.es

[**] Financial support was provided by the FICYT (PC06-016) and technical support by KONIK-TECH. J.R.E. acknowledges the MEC (European Social Fund) for a Ramón y Cajal contract, and S.C.D. acknowledges the FICYT for a PhD grant.

 Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200805545>.

Communications

postcolumn. This mass-flow controller was connected to a "Y" piece to enable the accurate and continuous mixing of the $^{13}\text{CO}_2$ tracer with the CO_2 formed after the combustion of every organic compound originally present in the GC-column eluent (Figure 1).

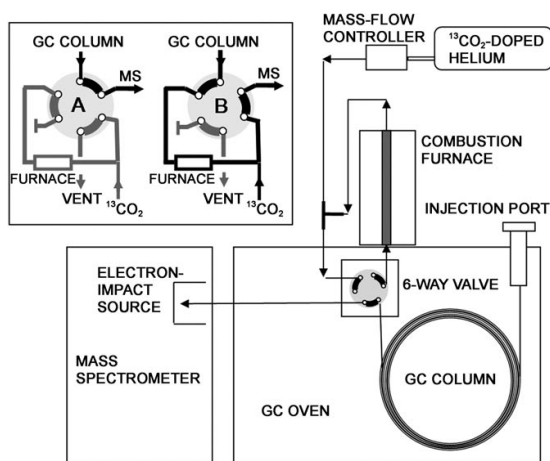


Figure 1. Schematic illustration of the setup showing the modifications made in the GC-MS instrument. The two possible valve configurations are shown at the top left: A, for structural identification by conventional GC-MS analysis, and B, for absolute quantification by postcolumn isotope dilution.

The home-made combustion furnace consisted of a ceramic tube (internal diameter: 0.5 mm) in which copper wires, previously oxidized to CuO , were introduced and maintained at a suitable temperature ($> 800^\circ\text{C}$).^[12] Platinum wires were also introduced to catalyze the combustion reaction. Figure 1 shows the whole instrumental setup. Minimal modification of a standard GC-MS system is required. Since we selected $^{13}\text{CO}_2$ as the tracer, efficient gaseous mixing is possible subsequent to the combustion reaction. The introduction of a six-way valve made it possible to operate the system in two configurations (A and B at the top left of Figure 1). In configuration A, the column is connected directly to the mass spectrometer, as in any commercial GC-MS instrument, to provide structural information on every organic compound present in the sample. If the valve is switched to configuration B, subsequent injection provides absolute quantitative data for each previously identified compound by using the postcolumn isotope dilution approach. Such a valve also prevents the solvent from entering the combustion furnace if the valve is kept in configuration A at the beginning of the analysis and only switched to configuration B when the solvent has already eluted. The same time delay is applied to the switching on of the electron-impact filament.

The performance of the setup was initially tested with a single organic compound, tetradecane. Figure 2 shows the chromatogram obtained at m/z 44 and 45, which correspond to $^{12}\text{CO}_2^+$ and $^{13}\text{CO}_2^+$, respectively. The measured ratio of

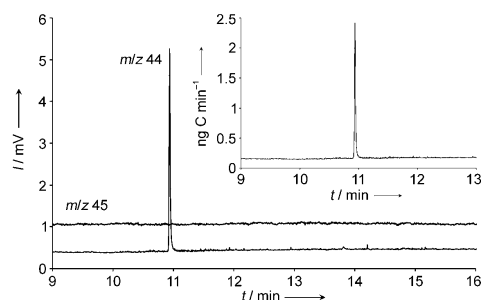


Figure 2. Intensity chromatogram of a single compound (tetradecane) after combustion (m/z 44), and signal corresponding to the postcolumn spiking (m/z 45). The inset shows the mass-flow chromatogram obtained after application of the isotope-dilution equation.

these two signals is almost equivalent to the ratio $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, since the influence of the oxygen natural isotopic composition is negligible. The prior determination of the ^{13}C concentration ($\text{nmol } ^{13}\text{C mL}^{-1}$) in the container by reverse isotope dilution with another pure standard (dodecane) in conjunction with the accurate tracer mass flow provided by the mass-flow controller (mL min^{-1}) gives the tracer mass flow ($\text{pmol } ^{13}\text{C min}^{-1}$) at every flow assayed. The stability of the mass flow was tested by connecting the exit of the $^{13}\text{CO}_2$ -mass-flow container directly to the mass spectrometer and measuring the variation in the tracer isotope ratio m/z 44/45 in a short-term (GC run, 30 min) and a long-term study (working day, 9 h). The results obtained, 0.0339 ± 0.0002 ($n = 8$) and 0.034 ± 0.001 ($n = 8$), respectively, clearly demonstrated the desired stability. It is therefore possible to carry out a single calibration of the tracer mass flow at the beginning of every working day. Figure 2 shows clearly that the signal measured at m/z 45 was completely constant along the gradient assayed. Interestingly, the combustion reaction and all the connections required did not lead to significant peak broadening. In fact, the peak width measured at half height (0.02 min) was identical to that observed with conventional GC-MS instruments (i.e. on switching to configuration A).

A combination of the contribution of the solvent tail, the small amount of air that probably enters at every connection between a fused-silica tube and the six-way valve, and the trace of air present in the ionization source does result in significant background noise at m/z 44 (0.4 mV; Figure 2). This contribution from air affected neither the accuracy nor the precision of the quantification, as it only translated into a relatively constant background in the mass-flow chromatogram (inset in Figure 2). This background turned out to be similar to that observed with other universal detectors, such as FID or MS in the scan mode.

Analytical figures of merit included an adequate dynamic range (assayed up to two orders of magnitude) and a detection limit of 0.8 pg Cs^{-1} , which translated into an excellent absolute detection limit of 3 pg of injected tetradecane. This detection limit is three orders of magnitude lower than that observed with postcolumn ^{13}C -isotope dilution and ICPMS (0.7 ng s^{-1}).^[8] It also compares very well with

those observed with typical GC detectors (FID: ca. 10 pg Cs^{-1} ; MS operated in scan mode: 1 pg Cs^{-1}). Unfortunately, the precision initially observed (10–15% RSD (relative standard deviation)) was limited by the high uncertainty associated with manual injection into the GC instrument (1 μL or less). Therefore, the use of an internal standard was evaluated. For that purpose, a known amount of an appropriate internal standard was always added to a known amount of the sample, both weighed exactly, so that knowledge of the exact volume of the sample injected was not necessary. An additional advantage of using an internal standard is that the relatively high complexity of the isotope-dilution calculations are reduced to a minimum, as recently described by Heilmann and Heumann for the analysis of sulfur-containing species by postcolumn isotope dilution and GC coupled to ICPMS.^[13] Briefly, the mass of C for the internal standard (m_{std} , known) and the mass of C for the species of interest (m_{s} , unknown) are related to the areas under the corresponding peaks (A_{std} and A_{s} , respectively), which must be integrated in the same mass-flow chromatogram. The response factor obtained for the internal standard ($m_{\text{std}}/A_{\text{std}}$) can then be used to calculate accurately and precisely the mass of C present in each chromatographic peak, simply by assuming an arbitrary tracer mass flow. Of course, such a simplification requires that the tracer mass flow should be completely stable along the chromatogram (a condition fulfilled in our system, as stated above).

The approach was validated by using an *n*-alkane standard mixture. Tetradecane was selected as the internal standard for the computation. Absolute errors in the quantification of the *n*-alkanes from C_{10} to C_{20} ranged from -7 to $+5\%$, and the precision level was lower than 4% RSD ($n=3$) for all compounds (see Table S1 in the Supporting Information). These results demonstrate that, as expected, every *n*-alkane was converted quantitatively into CO_2 in the combustion furnace independently of the length of its chain.

Next, a model mixture containing saturated (undecane, tridecane, and pentadecane), unsaturated (toluene, ethyl benzene, and *o,m,p*-xylene), and functionalized (butyl butyrate and hexyl butanoate) pure standards (purity > 99%) was created. Again, tetradecane was used as an internal standard. The mass-flow chromatogram and the quantitative results obtained are shown in Figure 3 and Table 1. The recovery for every organic compound analyzed agreed very well with the theoretical values and thus supported the universal character of the quantitative approach (unfortunately, the capillary GC column used was not able to separate *ortho*- and *para*-xylene, so quantitative results for these species are given together).

Finally, to check the performance of the quantitative setup for very complex real samples, we analyzed a diesel fuel directly after a simple dilution with *n*-hexane. The mass-flow chromatogram obtained is shown in Figure 4. In spite of the large number of compounds to be burnt in the furnace, the chromatogram does not show any tailing or degradation. The use of a very low temperature-programming rate (6°C min^{-1}) in combination with a 60 m long capillary column enabled satisfactory separation of the compounds to be analyzed. In this case, hexyl butanoate was selected as the internal standard, as tetradecane was present in the sample. Because

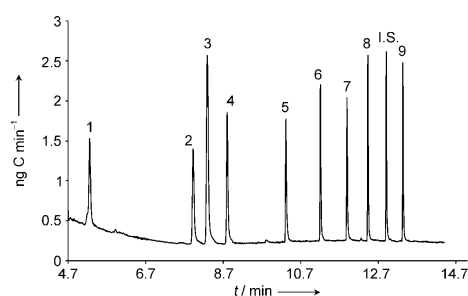


Figure 3. Mass-flow chromatogram of a model mixture containing different families of compounds (BTEX, esters, and alkanes). The identity of the chromatographic peaks (1–9) is given in Table 1.

Table 1: Absolute quantification results for the model mixture.^[a]

Peak	Compound	Found [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Expected [$\mu\text{g g}^{-1}$]	Recovery [%]
1	toluene	5.7 ± 0.3	6.1	93 ± 5
2	ethylbenzene	5.9 ± 0.3	6.1	97 ± 5
3	<i>o,p</i> -xylene	123 ± 0.7	12.2	101 ± 6
4	<i>m</i> -xylene	6.2 ± 0.3	6.1	101 ± 5
5	butyl butyrate	5.9 ± 0.3	5.6	105 ± 5
6	undecane	5.0 ± 0.3	4.7	106 ± 6
7	hexyl butanoate	5.6 ± 0.2	5.6	100 ± 4
8	tridecane	5.3 ± 0.2	5.1	104 ± 4
9	pentadecane	4.8 ± 0.2	4.9	98 ± 4

[a] Tetradecane was used as an internal standard. The uncertainty is expressed as the standard deviation for $n=5$ injections.

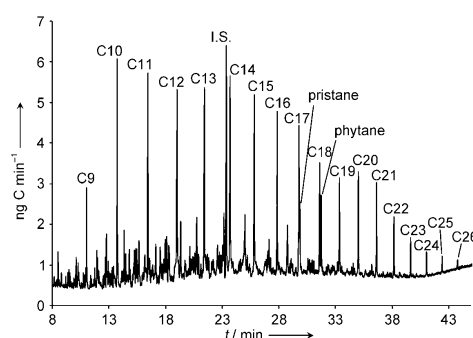


Figure 4. Mass-flow chromatogram of a diesel-fuel sample.

of the species-independent response demonstrated earlier, the most appropriate internal standard can be selected for a particular application. A complementary analysis in the standard GC–MS configuration of the system (position A in the six-port valve, Figure 1) was mandatory to identify the most abundant compounds and check for their peak purity. The main compounds detected and quantified (see Table S2 in the Supporting Information) were C_9 – C_{26} *n*-alkanes (Figure 4). Interestingly, some acyclic isoprenoids, such as pristane and phytane, which are typically used to calculate diagnostic ratios in oil-spill investigations, could also be quantified. The other dominant peaks corresponded to

Communications

different isoprenoid derivatives (e.g. 2,6-dimethylundecane at 19.3 min and 2,6,11-trimethyldodecane at 23.1 min). Similar quantification by either GC-FID or GC-MS would have required the use of calibration solutions composed of selected compounds to compute the average relative response factors for each group of nearest-eluting species corresponding to the different families of target analytes.^[14] Moreover, it would have been necessary to check the instrument calibration for every set of samples analyzed. Thus, time and money are saved with our universal quantitative approach, in which instrument calibration is performed continuously by the tracer flow.

In summary, we have presented the first application of postcolumn carbon-isotope dilution for the successful quantification of any organic species analyzed by GC with a molecular-ion source (electron ionization). The approach, which requires a simple low-cost modification of a standard GC-MS instrument, enables highly accurate and precise quantification of different carbon-containing species eluted from the GC column, without the need for specific standards for each target analyte. Moreover, this instrumental modification can be carried out without any loss of structural information or compound-confirmation capabilities provided by current GC-MS equipment. The expenses associated with the use of isotopically labeled CO₂ for “in situ” instrument calibration are negligible. This feature together with the saving in time and analytical standards (neither calibration nor checking for instrumental-response drift are required) result in a very cost-effective approach. Beyond its use for quantitative quality control in a wide range of standard laboratories, a powerful application of our approach can be foreseen in oil-spill fingerprinting, and in pharmaceutical and environmental analysis, for which the number of organic analytes is so large that it is impossible to have standards for each compound, if they even exist.

Experimental Section

Enriched sodium [¹³C]carbonate was purchased as a high-purity chemical reagent (≥ 98%) with an isotopic enrichment of 99%. CO₂ enriched in ¹³C was prepared as follows: A known amount (ca. 200 mg) of Na₂CO₃ (¹³C, 99%) was placed in a three-neck round-bottomed flask previously purged with He, and then H₃PO₄ (200 μL) was added to produce ¹³CO₂ under an atmosphere of He. A gas-tight syringe was used to extract 2 mL of the tracer and inject it into a 5 L gas container through a septum and an opening valve. The container was then pressurized to 6 atm with He. The standard solution of *n*-alkanes was purchased as a mixture containing 40 mg L⁻¹ of each *n*-alkane in hexane, with a purity grade suitable for gas chromatography. The model mixture containing different organic compounds was composed of a BTEX standard mixture (200 μg L⁻¹ each, purity

≥ 99%; BTEX stands for benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes) and individual standards of *n*-alkanes and esters (purity ≥ 99.7%). The solvent employed to dilute the different standards and mixtures was *n*-hexane (organic trace analysis grade). The diesel fuel was also diluted by weight in *n*-hexane (ca. 1:800) prior to analysis.

The combustion furnace consisted of a 60 cm × 0.5 mm (inside diameter, i.d.) × 3 mm (outside diameter) ceramic tube packed with copper and platinum wires, placed inside a quartz tube, and heated with a nichrome wire. The furnace temperature was set at 850 °C and regulated by an external temperature controller to within ± 1 °C. The valve employed was a two-position six-way stainless-steel valve with a 0.25 mm bore designed for operation at temperatures up to 350 °C. Fused silica capillaries (0.32 mm i.d.) and appropriate polyimide-coated fused silica adapters were used in the connections of the valve. All analyses were performed with a GC-MS instrument consisting of a Konik HRGC-4000 B gas chromatograph (Konik-Tech, Barcelona, España) coupled to a Konik MS Q12 C series quadrupole mass spectrometer equipped with an electron ionization source.

Received: November 13, 2008

Published online: February 23, 2009

Keywords: analytical methods · gas chromatography · isotopic labeling · mass spectrometry · quantification

- [1] B. Zhang, X. Li, B. Yan, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 299–301.
- [2] R. L. Grob, E. F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4th ed., Wiley, Chichester, **2004**, pp. 279–280.
- [3] A. Pereira Navaza, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 575–577; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 569–571.
- [4] M. Wind, M. Edler, N. Jakubowski, M. Linscheid, H. Wesch, W. D. Lehmann, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 29–35.
- [5] A. González-Gago, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García-Alonso, *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 1138–1144.
- [6] K. Heumann, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1992**, *118/119*, 575–592.
- [7] P. Rodríguez-González, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García-Alonso, A. Sanz-Medel, *Spectrochim. Acta Part B* **2005**, *60*, 151–207.
- [8] J. Vogl, K. G. Heumann, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2038–2043.
- [9] C. Smith, B. P. Jensen, I. D. Wilson, F. Abou-Shakra, D. Crowther, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1487–1492.
- [10] T. D. Mark, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1982**, *45*, 125–145.
- [11] J. F. Pickup, K. McPherson, *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1885–1890.
- [12] D. A. Merritt, K. H. Freeman, M. P. Ricci, S. A. Studley, J. M. Hayes, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2461–2473.
- [13] J. Heilmann, K. G. Heumann, *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1952–1961.
- [14] Z. Wang, S. Stout, *Oil Spill Environmental Forensics: Fingerprinting and Source Identification*, Academic Press (Elsevier), Masson S.A., Madrid, Spain, **2007**, pp. 257–291.



Supporting Information

© Wiley-VCH 2009

69451 Weinheim, Germany

A quantitative universal detection system for organic compounds in Gas Chromatography based on the use of isotopically enriched $^{13}\text{CO}_2$

Authors: S. Cueto Díaz, J. Ruiz Encinar,* A. Sanz-Medel, J. I. García Alonso*

Supplementary Table 1. Quantification of a n-alkanes standard mixture (C10-C20) using C14 as internal standard

Compound	Found [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Theoretical ^[i] [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Recovery ^[i]
Decane	8.3 \pm 0.2	8.0	104 \pm 3
Undecane	8.4 \pm 0.1	8.0	105 \pm 2
Dodecane	8.3 \pm 0.3	8.0	104 \pm 4
Tridecane	8.3 \pm 0.3	8.0	104 \pm 4
Pentadecane	7.7 \pm 0.1	8.0	96 \pm 2
Hexadecane	7.7 \pm 0.1	8.0	96 \pm 2
Heptadecane	7.4 \pm 0.3	8.0	93 \pm 4
Octadecane	7.9 \pm 0.1	8.0	99 \pm 2
Nonadecane	7.8 \pm 0.1	8.0	98 \pm 2
Eicosane	8.3 \pm 0.2	8.0	104 \pm 3

[i] Uncertainty corresponds to 1 standard deviation (n=3)

Supplementary Table 2. Quantitative results obtained for the gasoil sample using Butyl hexanoate as internal standard

Compound	Found ^[i] [$\mu\text{g g}^{-1}$]
Nonane	4100 \pm 230
Decane	14800 \pm 130
Undecane	16600 \pm 440
Dodecane	16200 \pm 370
Tridecane	17200 \pm 630
Tetradecane	16400 \pm 410
Pentadecane	15000 \pm 430
Hexadecane	12000 \pm 720
Heptadecane	10400 \pm 520
Pristane	6000 \pm 560
Octadecane	8200 \pm 620
Phytane	6200 \pm 440
Nonadecane	6900 \pm 560
Eicosane	6400 \pm 480
Eneicosane	5600 \pm 590
Docosane	4000 \pm 500
Tricosane	2600 \pm 300
Tetracosane	1700 \pm 120
Pentacosane	1000 \pm 100
Hexacosane	700 \pm 40

[i] Uncertainty corresponds to 1 standard deviation (n=3)

D.1.2 Desarrollo detallado del sistema GC-combustión-(EI)MS y aplicación a la evaluación cuantitativa de la micro-extracción en fase sólida en espacio de cabeza

D.1.2.1 Artículo científico II: Anal. Chem. 2010, 82, 6862-6869

“Gas chromatography-combustion-mass spectrometry with postcolumn isotope dilution for compound-independent quantification: its potential to assess HS-SPME procedures”

***Autores:** Sergio Cueto Díaz, Jorge Ruiz Encinar, Alfredo Sanz Medel, José Ignacio García Alonso*

Gas Chromatography-Combustion-Mass Spectrometry with Postcolumn Isotope Dilution for Compound-Independent Quantification: Its Potential to Assess HS-SPME Procedures

Sergio Cueto Díaz, Jorge Ruiz Encinar,* Alfredo Sanz-Medel, and J. Ignacio García Alonso*

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

A quadrupole GC-MS instrument with an electron ionization (EI) source has been modified to enable application of postcolumn isotope dilution analysis for the standardless quantification of organic compounds injected in the gas chromatograph. Instrumental modifications included the quantitative conversion of the separated compounds into CO₂, using a postcolumn combustion furnace, and the subsequent mixing of the gas with a constant flow of ¹³CO₂ diluted in helium. The online measurement of the ¹²CO₂/¹³CO₂ (44/45) ratio in the EI-MS allowed us to obtain quantitative data without resorting to compound-specific standards. Validation of the procedure involved the analysis of standard solutions containing different families of organic compounds (C₉–C₂₀ linear hydrocarbons, BTEX and esters) obtaining satisfactory results in all cases in terms of absolute errors (<6%) and precision (<4% RSD). The developed procedure showed excellent linearity over the range assayed (2 orders of magnitude) and adequate detection limits for carbon containing compounds (0.8 pg C s⁻¹). The generic value of this compound-independent calibration approach was assessed by studying the quantitative performance of Head Space-Solid Phase Microextraction (HS-SPME). The proposed compound-independent quantification by EI-MS permits comparison of the performance of different fibers by assessing analyte recoveries with extreme robustness, simplicity, and precision.

Gas chromatography (GC) is the separation technique of choice to resolve mixtures of thermally stable volatile or semivolatile compounds and is an essential tool in both research and routine laboratories.¹ A number of detection systems have been coupled to a gas chromatograph to obtain qualitative and/or quantitative information of the GC eluent, including flame ionization, mass spectrometry, nitrogen–phosphorus, atomic emission, electron capture, and others. In most cases, quantitative analysis in GC requires the determination of the detector response factor

for each analyte.¹ This task is usually carried out by building calibration plots for each compound of interest from solutions of known concentration, so, individual standards for every compound to be analyzed are mandatory. Unfortunately, this methodology is costly and time-consuming and becomes more and more tedious as the number of compounds of interest increases. Moreover, the rapid development of the pharmaceutical and pesticide industries among others, has led to an exponential growth in the number of compounds requiring analysis by GC and for which pure or certified standards may not be available. Compound-independent calibration, avoiding the need for specific standards, has therefore become a desirable target in modern Analytical Chemistry research. So far, certain atomic detectors are able to provide a quantitative elemental response independent of the chemical structure of the molecules. Traditionally, this concept has exclusively been materialized by hyphenating GC with a microwave induced plasma with atomic emission detection (MIP-AED)^{2,3} with an ICPMS^{4,5} or, to a lesser extent, with Chemical Reaction Interface Mass Spectrometry (CRIMS).⁶

In the case of ICPMS, its compound-independent calibration capabilities are recognized worldwide and have been boosted lately by the use of postcolumn isotope dilution analysis (IDA) in trace element speciation.⁷ In this IDA technique, a compound containing an enriched isotope of the element to be measured by ICPMS is added continuously after the chromatographic separation. Then, the isotope ratios between the most abundant (natural and enriched) isotopes are measured continuously. Since the ICP source produces a complete breakdown of the molecules into their individual atoms, isotopic equilibration in the plasma between the natural and the enriched isotopes is guaranteed, even after gradient elution.⁸ After application of the IDA equation,⁷ a mass flow chromatogram is obtained in which the integration of every single peak provides the absolute amount of the element in that peak. Of course, this can be related to the amount of the

* To whom correspondence should be addressed. (J. I. G. A.) Phone: +34-985103484. Fax: +34-985103125. E-mail: jiga@uniovi.es. (J. R. E.) Phone: +34-985103069. Fax: +34-985103125. E-mail: ruizjorge@uniovi.es.

(1) Grob, R. L.; Barry, E. F. *Modern Practice of Gas Chromatography*, 4th ed.; Wiley: Chichester, 2004.

(2) Van Stee, L.; Brinkman, U. *Trac-Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 618–626.

(3) Elbast, W.; M, S.; Caubet, M. S.; D.; Deruaz, D.; Brazier, J. L. *Anal. Lett.* **2009**, *32*, 1627–1641.

(4) González-Gago, A.; Marchante-Gayón, J. M.; García-Alonso, J. I. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 1138–1144.

(5) Pröfrock, D.; Leonhard, P.; Wilbur, S.; Prange, A. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 623–631.

(6) Chace, H. C.; Abramson, P. A. *Anal. Chem.* **1989**, *61*, 2724–2730.

(7) Rodríguez-González, P.; Marchante-Gayón, J. M.; García-Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. *Spectrochim. Acta, Part B* **2005**, *60*, 151–207.

(8) Schwarz, A.; Heumann, K. G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 212–219.

corresponding compound if its chemical formula is known. Until now such methodology has been exclusively applied to the quantitative determination of compounds containing ICPMS detectable elements for trace-elemental speciation of metals⁹ or semimetals.^{10,11} Unfortunately, the use of the ICPMS for the detection of carbon, hydrogen, nitrogen, or oxygen is seriously hampered by the low ionization yields of these elements in the ICP and the high carbon background under normal ICP operating conditions (atmospheric pressure). In fact, there are only two reports so far describing the use of HPLC and the postcolumn addition of ¹³C-labeled species for the quantification of organic compounds by ICP-MS.^{12,13} In both cases, the observed detection limits were not satisfactory.

For the MS detection of organic compounds, previously separated by GC, electron ionization (EI) is the most common ionization source employed. It provides both structural and quantitative information of any volatile organic compound injected in the gas chromatograph. Unfortunately, as pointed out before, it requires specific analytical standards as its response is structure-specific for each single molecule subjected to analysis.¹⁴ Recently, we have introduced a new quantitative detection concept in gas chromatography, based on the postcolumn addition of ¹³CO₂ for carbon isotope dilution analysis using EI.¹⁵ This concept constitutes a patented procedure in which organic compounds separated by liquid or gas chromatography are converted quantitatively into carbon dioxide, by an oxidation or combustion reaction, and then are mixed with a postcolumn flow of enriched ¹³CO₂.¹⁶ This procedure should provide quantitative information of every single compound previously separated in the chromatograph without the need for individual standards. We selected electron ionization because it operates under high vacuum conditions providing much better sensitivity and lower background for carbon detection than the above-mentioned ICP atmospheric source. For the correct application of isotope dilution analysis conversion of all carbon containing compounds to a unique chemical species is required (isotope equilibration). The isotopic equilibrium between the ¹³C-containing species continuously added postcolumn (¹³CO₂) and the separated organic compounds is reached by their quantitative conversion into CO₂, after the chromatographic separation, in a combustion furnace.¹⁷ As the only species to be finally measured by EI is CO₂, compound independent response and isotopic equilibration is finally obtained. This approach can become a universal quantitative detector in GC-MS analysis, without the classical need for specific standards and, what is more, it is compatible with the exceptional structural identification capabilities provided by current GC-EI-MS instruments. Thus, in this work

- (9) Sariego-Muñiz, C.; Marchante-Gayón, J. M.; García-Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. *J. Anal. At. Spectrom.* **2001**, *16*, 587–592.
- (10) Giusti, P.; Schaumlöffel, D.; Ruiz-Encinar, J.; Szpunar, J. *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, *20*, 1101–1107.
- (11) Heilmann, J.; Heumann, K. G. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 1952–1961.
- (12) Vogl, J.; Heumann, K. G. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 2038–2043.
- (13) Smith, C.; Jensen, B. P.; Wilson, I. D.; Abou-Shakra, F.; Crowther, D. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1487–1492.
- (14) Mark, T. D. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* **1982**, *45*, 125–145.
- (15) Cueto-Díaz, S.; Ruiz-Encinar, J.; Sanz-Medel, A.; García-Alonso, J. I. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 2561–2564.
- (16) Ruiz-Encinar, J.; García-Alonso, J. I. World Intellectual Property Organization, Spain; International Patent WO 2007/042597 A1, 2007.
- (17) Merritt, D. A.; Freeman, K. H.; Ricci, M. P.; Studley, S. A.; Hayes, J. M. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2461–2473.

we describe the instrumental developments and its analytical features for integral characterization and determination of organic compounds in detail.

Furthermore, the compound-independent quantification provided by the developed approach can be an inestimable tool in the optimization and quantitative assessment of sample extraction and preconcentration procedures applied prior to GC-MS analysis. For instance, solid-phase microextraction (SPME) is today a widely used preconcentration technique in Gas Chromatography.¹⁸ Fiber absorption and recovery are common parameters used when validating a given SPME procedure. However, those two parameters are almost impossible to compute using conventional approaches.¹⁹ In fact, it is necessary to inject specific liquid standards and to assume that the transfer efficiency in the GC injector for every compound under analysis is the same when using conventional injection and the thermal desorption. Thus, the important topic of absolute absorption yields will be evaluated in this work, as exemplified for the HS-SPME analysis of BTEX (Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and *o,m,p*-Xylenes) in different water samples, using the proposed IDA-EI-MS quantification procedure.

EXPERIMENTAL SECTION

Reagents and Materials. Solid enriched Na₂CO₃ (99% ¹³C enrichment) was obtained as a highly pure chemical reagent (purity >98%) from Cambridge Isotopes Laboratories (Andover, Massachusetts, USA). A standard mixture of *n*-alkanes (40 µg/mL each in *n*-hexane) was purchased from Fluka (Seelze, Germany). Phosphoric acid (99% puriss.) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Individual compounds (undecane, dodecane, tridecane, pentadecane, butyl butyrate, and hexyl butanoate) with certified purities ranging from 99 to 99.7% were used as analytical standards (Fluka, Seelze, Germany or Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A solution of 1,2,4-trimethylbenzene in methanol (5000 µg/mL) and a BTEX standard mixture (2000 µg/mL each in methanol) were both from Supelco (Bellefonte, USA). Ultrapure water (18.2 MΩcm) was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA). *n*-Hexane for organic trace analysis grade was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). SPME holder and fibers were purchased from Supelco (Bellefonte, USA).

Instrumentation. *GC-MS.* A Konik-Tech (Sant Cugat del Vallés, Spain) 4000-B Gas Chromatograph coupled to a Konik-Tech MS-Q12 quadrupole mass spectrometer with an electron ionization source was used. This instrument uses a specially designed injector which keeps the septum at relatively low temperature, does not require a septum purge flow, and minimizes losses of organic compounds in the injector port. The analytical column was a 30 m long (0.32 mm internal diameter, 0.25 µm stationary phase) DB-XLB column (Agilent J&W Scientific, Santa Clara, USA). The sample volume injected in the GC was always 1 µL using manual injection. Sample injection was performed in the splitless (1 min)/split mode. Carrier gas flow was set at 1 mL/min for all samples and conditions.

Six-Way Valve. A manually actuated 0.25 mm bore stainless-steel six-way two-position valve (VICI AG International, Schenkon,

- (18) Vas, G.; Vekey, K. *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 233–254.
- (19) Langefeld, J. J.; Hawthorne, S. B.; Miller, D. *J. Anal. Chem.* **1996**, *68*, 144–155.

Switzerland), was placed inside the chromatographic oven to bypass the combustion furnace when required. The valve has an extension between the body and the actuator which allows the valve to be mounted in the heated zone while the handle remains outside at ambient temperature. This valve prevented the solvent from entering the combustion unit and therefore enlarged the catalytic activity of the Cu and Pt wires. Additionally, the valve allowed the direct connection of the column with the EI source for conventional GC-MS work in order to identify the different species under analysis by their fragmentation pattern. Moreover, such qualitative analysis is essential to assess peak purity for each compound. For postcolumn isotope dilution analysis the valve was initially in the "load" position (combustion oven bypassed) and the valve was manually switched to the "inject" position at the same time that the EI filament switched on. All connections between the valve and the rest of the components of the system were performed by means of 0.32 mm i.d. deactivated fused silica capillaries and fixed to the valve with appropriate polyimide coated fused silica adapters (VICI AG International, Schenkon, Switzerland).

Combustion Furnace. The laboratory-made combustion furnace consisted of a 60 cm long ceramic tube (3 mm O.D., 0.5 mm I.D.) (Elemental microanalysis, Devon, U. K.) filled with copper and platinum wires and heated by a Nichrome wire. Proper thermal isolation of the combustion furnace was provided with glass wool. The combustion furnace was set vertically on top of the GC with the lower end of the ceramic tube inside the chromatographic oven to avoid cold spots after the separation. High temperatures were accurately controlled using a temperature sensor and an external controller, allowing temperature settings inside the tube to be within ± 1 °C over a wide temperature range (50–1200 °C). The copper wires were previously oxidized by passing an oxygen flow (1 mL/min) at 450 °C during 4–5 h and this procedure was performed on a weekly basis to preserve its oxidizing capabilities. Fused silica capillaries (0,32 mm i.d.) were used to connect the furnace to the valve and to the ion source respectively. For this purpose a length (~1 cm) at one end of each capillary was uncoated, to prevent the polyimide coating to be burnt, and introduced into the ceramic tube. Reducing unions 1/8" to 1/16" (SGE, Victoria, Australia) and appropriate graphite ferrules (0.5 mm i.d.) were used to hold the capillaries in place at both sides of the ceramic tube. For oxidation and combustion, the furnace was operated at 850 °C.

Gas Cylinder and Mass Flow Controller. The $^{13}\text{CO}_2$ container was a dual inlet 5 L high pressure stainless steel gas cylinder (Iberfluid, Barcelona, Spain). The cylinder was equipped on one end with, in this order, an opening valve, a Swagelok tee where helium could be introduced from a high pressure cylinder, and a second opening valve connected to the other end of the tee. This second valve was connected to a septum for the manual injection of gases into the cylinder. Before the cylinder was pressurized, $^{13}\text{CO}_2$ was injected into the container by means of a gastight syringe (Hamilton, Reno, U. S. A.) through this valve. After the injection of the tracer, the valve was closed and the container was pressurized up to 6 bar with helium using the connection in the Swagelok tee. When the set pressure was reached the filling valve was also closed. At the other end of the cylinder a pressure gauge, an opening

valve and a mass-flow controller (Bronkhorst, Ruurlo, Netherlands) calibrated for He were coupled for the accurate control of the tracer flow. The opening valve was closed during the filling of the cylinder, remaining open the rest of the time. The flow rate for the postcolumn spike was set at 0.5 mL/min. Effluent and spike flows were mixed after combustion by means of a 0.25 mm bore stainless steel microvolume "Y" connector (VICI AG International, Schenkon, Switzerland).

The whole instrumental setup is shown in Figure 1. As can be observed, the instrument can be operated in the standard GC-MS configuration (qualitative) or in the combustion-postcolumn configuration (quantitative) depending on the position of the switching valve.

Procedures. Preparation of $^{13}\text{CO}_2$. The spike was prepared from ^{13}C enriched Na_2CO_3 (99%). An accurate weighed amount (~200 mg) was placed in a 25 mL three-necked round-bottomed flask, previously purged with He to avoid natural abundances CO_2 contamination from ambient air. A small quantity (300 μL) of concentrated H_3PO_4 , was injected into the flask through a septum cap. After the acid–base reaction, 4 mL of the gaseous phase, containing $^{13}\text{CO}_2$ diluted in He, were removed using a gastight syringe and injected into the container shown in Figure 1.

Calibration of the $^{13}\text{CO}_2$ Postcolumn Flow. The flow rate of the spike could be accurately controlled by the mass flow controller between 0.1 and 5 mL min^{-1} . In our experiments, it was set at 0.5 mL min^{-1} . The exact mass flow (ng of $^{13}\text{CO}_2$ per min) being mixed with the natural CO_2 coming from the column and combustion furnace was determined by adding internal standards of known concentration spiked to the sample as described before.^{11,15}

Quantification using Postcolumn Isotope Dilution. In our case, the isotope ratio $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ was measured as the signal ratio at masses 44 and 45 (I_{44}/I_{45}) corresponding to the continuous blend of natural abundance $^{12}\text{CO}_2$ present in the chromatographic eluent and the enriched $^{13}\text{CO}_2$, added postcolumn. Selected Ion Monitoring (SIM) at masses 44.0 and 45.0 was performed for the duration of the chromatogram with 70 ms integration time per mass. The mass window was ~0.1 mass units. Then, the isotope ratio in the blend, $R_b = I_{44}/I_{45}$, was calculated to build the isotope ratio chromatogram (R_b vs time). The postcolumn isotope dilution equation,⁷ shown as equation¹ below, was then applied to every point in the chromatogram to obtain the mass-flow chromatogram (ng of C/min vs time). The integration of the mass flow chromatogram directly provided the amount of carbon (in ng) eluted in each chromatographic peak.

$$\text{MF}_n = \text{MF}_t \frac{\text{AW}_n A_t^{13}}{\text{AW}_t A_n^{12}} \left(\frac{R_b - R_t}{1 - R_b R_n} \right) \quad (1)$$

In this equation MF_n corresponds to the mass flow of carbon from the natural abundance sample injected, whereas MF_t corresponds to the mass flow of carbon from the postcolumn spike or tracer. AW_n and AW_t correspond to the atomic weight of carbon in the sample and tracer, respectively. The isotope abundances A_t^{13} and A_n^{12} correspond to the isotopic composition of ^{13}C in the tracer and ^{12}C in the sample. Finally, R_t is the

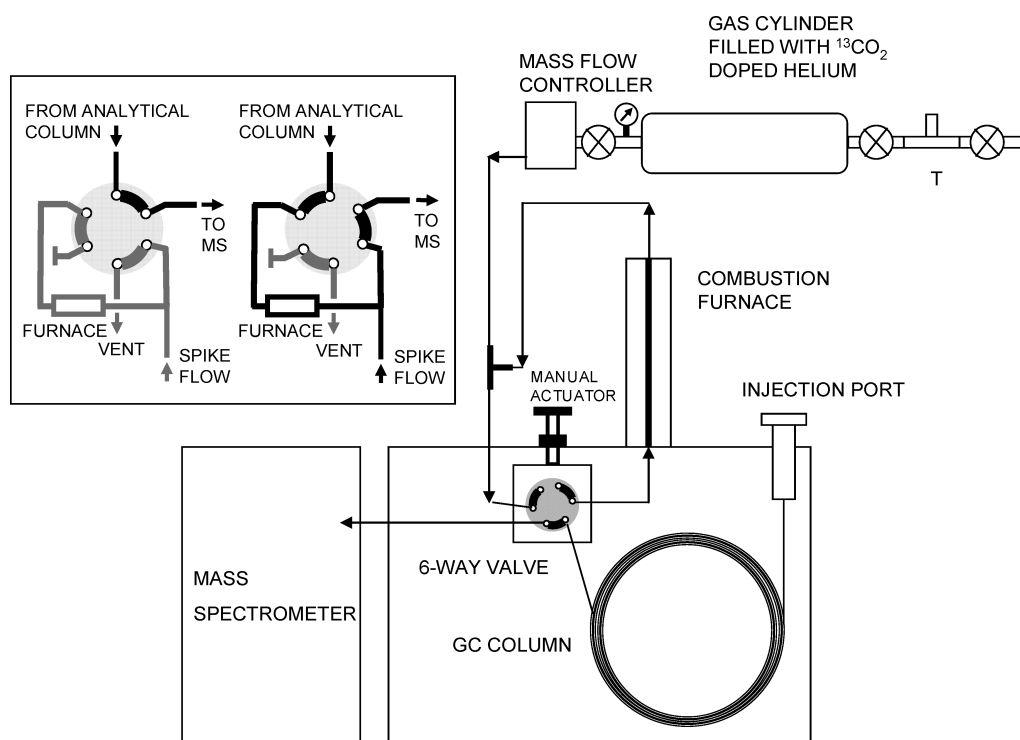


Figure 1. Schematic illustration of the setup showing the modification made in the GC-MS instrument. The two possible valve configurations are shown in the inset: Left, for structural identification by conventional GC-EI-MS analysis, and right, for absolute quantification using GC-Combustion-MS and postcolumn addition of $^{13}\text{CO}_2$. Adapted from reference.¹⁵

isotope ratio (12/13) in the tracer and R_n is the natural isotope ratio (13/12) in the sample, whereas R_b is the measured isotope ratio in the blend.

Additionally, eq 1 can be used to quantify the mass flow of enriched carbon dioxide when an internal standard of known concentration is spiked to the sample.

Head-Space SPME Procedure. Test solutions (~ 10 ng/g) were prepared by diluting appropriately the BTEX standards in Milli Q water. Samples of ~ 7 g were pipetted into 10 mL glass vials with open-top phenolic closures and PTFE/silicone septa (Supelco, Bellefonte, USA). Three fiber coatings, 100 μm polydimethylsiloxane (PDMS), 70/30 μm polydimethylsiloxane/divinylbenzene (PDMS/DVB), and 50/30 μm carboxen/polydimethylsiloxane/divinylbenzene (CAR/PDMS/DVB) were tested for comparative purposes. Samples were saturated in all cases with NaCl to improve extraction efficiency and stirred at 900 rpm at 30 $^\circ\text{C}$ during 30 min to allow equilibration between the liquid and gas phases. Then the fibers were inserted in the headspace and extracted during 15 min to ensure equilibrium conditions between the headspace and the fiber. After extraction, the fibers were removed and thermal desorption was carried out in the injection port of the GC at 250 $^\circ\text{C}$.

RESULTS AND DISCUSSION

Online Continuous Measurement of the $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ Isotope Ratios. The optimum conditions for the continuous measurement of $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ isotope ratios were established by connecting directly the reservoir that contained the $^{13}\text{CO}_2$ spike to the mass

spectrometer.¹⁵ The mass spectrum obtained for the mass range 43–47 when such postcolumn flow was set at 1 mL/min is provided in the Supporting Information (Figure SI-1). The ^{13}C isotope enrichment in the postcolumn spike ($\sim 97\%$) can be clearly seen from the spectrum. Resolution was optimized while still preserving a good sensitivity. The mass resolution finally allowed baseline separation even for isotope ratios very far from 1. The experiments performed for the selection of the optimum integration time are given in the Supporting Information (Figure SI-2). An integration time of 70 ms was finally selected considering both the precision in the ratio measurement and the number of points per chromatographic peak (~ 15) to obtain well-defined peak profiles.

Spike Enrichment and Stability of the $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$ Isotope Ratio. Again, to estimate the ^{13}C enrichment obtained after the preparation of the $^{13}\text{CO}_2$ spike, its reservoir was connected directly to the mass spectrometer. A constant flow of 1 mL min^{-1} was set and the signals at m/z ratios 44 and 45 were continuously monitored during 2 min for each independent isotope ratio measurement under the measurement conditions described in the procedures. The isotope ratio was calculated obtaining an average value of 0.034 ± 0.0003 , which corresponds to a ^{13}C abundance of $96.70 \pm 0.02\%$ ($n = 5$) (see the mass spectrum shown in the Figure SI-1). The slight difference between the experimentally obtained enrichment and that provided for the precursor $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ by the supplier (99%), can be ascribed to small contaminations by natural abundance CO_2 from the ambient air during the generation of the tracer

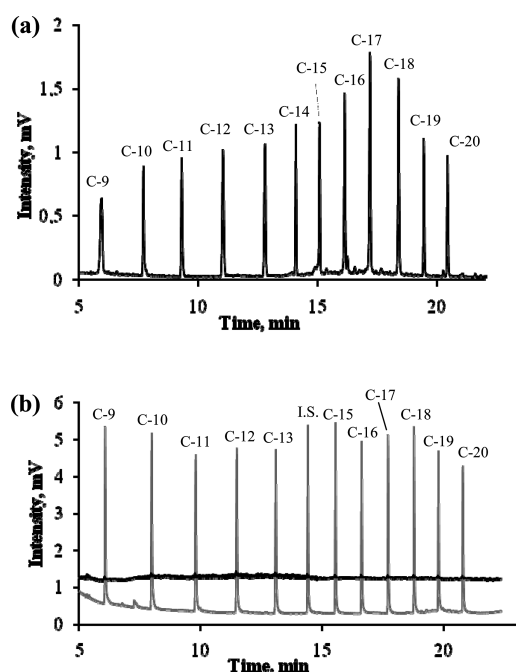


Figure 2. Intensity chromatograms for the *n*-alkanes mixture obtained in the SIM mode: (a) at $m/z = 71$ operating the setup in the qualitative configuration; (b) at $m/z 44$ and 45 operating the setup in the quantitative configuration.

and the filling of the reservoir, traces of this compound possibly present in the Helium gas used to dilute $\text{de } ^{13}\text{CO}_2$ and traces of air still present in the EI source. The high enrichment obtained provides a very wide range of optimum analyte/spike ratios and then a sample containing compounds in a large range of concentrations could be quantified in the same analysis without affecting the accuracy of the results.³

The short-term (30 min) and long-term (9 h) stability of the $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ isotope ratio is given in the Supporting Information (Figures SI-3 and SI-4). In both cases the measured isotope ratios, 0.0339 ± 0.0002 and 0.034 ± 0.001 ($n = 8$), respectively, were remarkably stable. Similar results were obtained in different days indicating that the setup was robust enough for routine analysis.

Evaluation of the GC-Combustion-IDMS System. The overall performance of the developed instrumentation was evaluated here by analyzing a standard solution of a mixture of *n*-alkanes ($\text{C}_9\text{--C}_{20}$). To study peak broadening, $1 \mu\text{L}$ of a solution containing approximately $5 \mu\text{g/g}$ of these compounds in *n*-hexane was injected in the chromatograph both in the qualitative (combustion oven bypassed) and quantitative (through the oven) modes. The Selected Ion Monitoring chromatogram obtained at $m/z = 71$ (fragment characteristic of *n*-alkanes) is shown in Figure 2a, whereas the chromatogram obtained at masses 44 and 45 after combustion and postcolumn isotope dilution analysis is shown in Figure 2b. As can be observed, no significant peak broadening due to the combustion unit or to the different connections was observed, being the peak width measured at the half height equal to that found when operating the

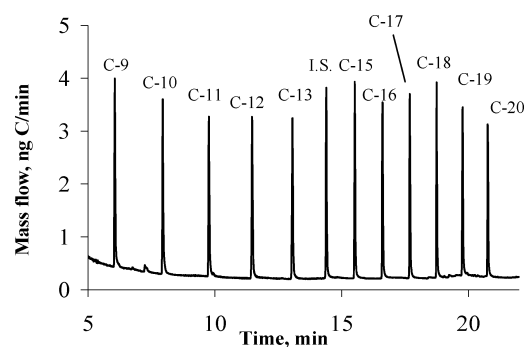


Figure 3. Mass flow chromatograms obtained for the *n*-alkanes mixture.

GC-MS in the conventional way (0.02 min, Figure 2a). Only a small increase in retention times was observed (~ 20 s) because of the combustion furnace. The mass flow chromatogram obtained after the application of the online isotope dilution equation (eq 1) is shown in Figure 3. As can be observed, the sensitivity is roughly constant for all compounds which is in clear contrast with the results shown in Figure 2a for mass 71 without combustion (SIM detection). The peak areas in the mass flow chromatogram were linear with the amount of carbon injected over 2 orders of magnitude (the maximum range assayed). The detection limit obtained for tetradecane was 9 ppb (ng/g) based on three times the standard deviation of the baseline. Taking into account that the injection volume was $0.5 \mu\text{L}$, this value corresponds to an absolute limit of detection of 3 pg of tetradecane injected. If we take into account the peak width at the baseline (4s approximately in this particular case), then we can make our detection limit independent of the column employed and the carrier gas flow-rate. The value found was 0.8 ng C s^{-1} , being in the same order that those provided by a mass spectrometer in full scan mode (1 pg C s^{-1}) and clearly better than those of a flame ionization detector (10 pg C s^{-1}). This detection limit is mainly limited by the background level observed at $m/z = 44$, and explains the difference in comparison with the detection limit achievable using the mass spectrometer in SIM mode bypassing the oven (typically 0.1 pg C s^{-1}) in spite of the fact that both sensitivities were very similar. In contrast, it should be mentioned that the EI detection limit observed is 3 orders of magnitude lower than that obtained for carbon using ^{13}C postcolumn isotope dilution and ICP-MS detection (0.7 ng C s^{-1}).¹²

For the quantitative analysis of the standard mixture of *n*-alkanes ($\text{C}_9\text{--C}_{20}$) we needed first to quantify the mass flow of postcolumn $^{13}\text{CO}_2$. Out of the two possibilities of using internal standard (IS) or external standard, we selected an IS because it provided the advantage of compensation for small variations in the sample volume injected (we were using manual injection). Moreover, as recently pointed out by Heilmann and Heumann,¹¹ an additional advantage of using an internal standard is that the mass flow of enriched carbon dioxide does not need to be determined. The peak areas of both the analyte and the internal standard in the mass flow chromatogram are related to the unknown mass flow of spike (eq 1). However, the ratio of peak areas analyte/IS will be equal to the actual ratio of concentrations in the injected sample and independent of the mass flow of spike used in the calculations. Thus, quantification

Table 1. Absolute Quantification Results for the Alkane Model Mixture^a

compound	added ($\mu\text{g/g}$)	found ($\mu\text{g/g}$)
nonane	8.0	8.3 \pm 0.5
decane	8.0	8.3 \pm 0.2
undecane	8.0	8.4 \pm 0.1
dodecane	8.0	8.3 \pm 0.3
tridecane	8.0	8.3 \pm 0.3
tetradecane	8.0	I.S.
pentadecane	8.0	7.7 \pm 0.1
hexadecane	8.0	7.7 \pm 0.1
heptadecane	8.0	7.4 \pm 0.3
octadecane	8.0	7.9 \pm 0.1
nonadecane	8.0	7.8 \pm 0.1
eicosane	8.0	8.3 \pm 0.2

^a Tetradecane was used as an internal standard. The uncertainty is expressed as the standard deviation for $n = 3$ injections.

of the amount of carbon under each peak can be determined just by calculating the areas of the internal standard and those corresponding to the other organic compounds. Therefore, the knowledge of the spike mass flow is not needed. The quantitative results obtained from the data shown in Figure 3, using tetradecane as internal standard, are given in Table 1. As can be observed, this methodology allowed us to quantify a series of organic compounds containing from 9 to 20 atoms of carbon and with a range of boiling points from 128 to 343 °C, with acceptable precision (<4% RSD, $n = 3$) and accuracy (-7 to +5%, expressed as relative error), without the need for specific standards for each compound or individual calibration plots. In order to evaluate the applicability of the approach to more complex organic compounds, mixtures containing saturated, unsaturated, and functionalized compounds were analyzed (see Supporting Information, Table SI-1). Again, the results obtained were satisfactory in terms of both precision and accuracy.

In principle, the method should work for all compounds that can be separated by Gas Chromatography. For compounds containing heteroatoms (such as Cl, Br, or S) their quantitative oxidation in the combustion oven will need to be studied. In the case of samples that contain less volatile compounds, the use direct or on-column injection would be advisable to minimize possible losses in the injection port. Also, accurate quantitative analysis of samples in which the number of compounds to quantify is very large (i.e., environmental samples) will require complete chromatographic resolution as the method is non-selective (all carbon containing compounds will be detected).

Quantitative Assessment of the HS-SPME Technique.

Since its introduction by Pawliszyn in 1990,²⁰ SPME has been established as a suitable alternative for sample preparation during trace and ultratrace GC-MS analysis. It is worth stressing that SPME is a nonquantitative extraction technique in which variable fractions of each analyte, depending on its nature and affinity for the fiber, are recovered from the sample matrix under determined extraction conditions. Variables such as sample matrix, ionic strength, extraction temperature, and extraction time are critical in most SPME procedures. In order to avoid lengthily standard addition methods, the fiber extraction yield for each compound

(20) Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145–2148.

Table 2. Comparison of Absolute Recoveries Obtained for Three Different Types of SPME Fibers Using the Proposed Approach^a

compound	added (ng)	absolute recovery (%)		
		PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS/DVB
benzene	78.0	1 \pm 0.1	19 \pm 0.6	35 \pm 6
toluene	79.5	4 \pm 0.3	52 \pm 0.3	58 \pm 3
ethylbenzene	79.7	8 \pm 1	58 \pm 0.2	59 \pm 3
<i>m,p</i> -xylene	79.7	9 \pm 1	60 \pm 0.4	66 \pm 3
<i>o</i> -xylene	79.5	12 \pm 1	71 \pm 1	78 \pm 2
1,2,4-trimethylbenzene	81.4	21 \pm 3	65 \pm 4	68 \pm 2

^a The uncertainty is expressed as the standard deviation for $n = 3$.

of the sample should be determined.²¹ This process is not easy to perform due to the characteristics of the SPME technique and it is normally carried out by comparing the peak areas obtained using SPME from spiked samples with those obtained from direct splitless injections of standards solutions. This procedure is based on the assumption that the transfer efficiencies in the GC injector are the same for both, liquid injection and SPME, and such requirement must be fulfilled for each target analyte. Unfortunately, both types of sample introduction are affected by different variables²² and important errors can be made if special attention is not paid to it. Hence, the reliable calculation of absolute recoveries in SPME remains a daunting challenge. We have evaluated our GC-Combustion-IDMS procedure for the determination of absolute extraction yields in SPME in the headspace mode (HS-SPME) as, in theory, the integration of the chromatograms provides directly the absolute amount (in ng of carbon) of each compound that has been actually extracted from the solution to the fiber. Once mass flow has been accurately and precisely measured using optimum conditions and well characterized standards (such as tetradecane and 1,2,4-trimethylbenzene) it remained constant throughout the working day and thereby can be safely applied to the HS-SPME experiments. Therefore, the extraction yields for each target compound can be easily calculated (as we know the total amount of analyte present in standard solutions or spiked to the sample).

To evaluate such applicability of our instrumental setup for fundamental studies in HS-SPME, three different fiber coatings commonly employed in BTEX analysis (PDMS, PDMS/DVB, and CAR/PDMS/DVB) were selected for comparative purposes. Samples of ~7 g containing ~10 ng/g of BTEX and 1,2,4-trimethylbenzene were extracted under the conditions indicated in the procedures and absolute recoveries for each type of fiber were calculated based on postcolumn isotope dilution analysis. Table 2 shows the total amount of carbon in the test solution for each compound and the absolute recoveries obtained for the three fiber coatings tested. As can be observed, the PDMS fiber provided the lowest recoveries for all of the analytes under the conditions assayed, whereas the recoveries obtained using the PDMS/DVB and CAR/PDMS/DVB fiber were much higher and very similar (with the exception of benzene, which was more efficiently extracted by the CAR/PDMS/DVB fiber). Unfortu-

(21) Barroso, M.; Gallardo, E.; Margalho, C.; Ávila, S.; Marqués, E. P.; Vieira, D. N.; López-Rivadulla, M. J. *Chromatogr. B* **2005**, *816*, 29–34.

(22) Ouyang, G.; Chen, Y.; Setkova, L.; Pawliszyn, J. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1097*, 9–16.

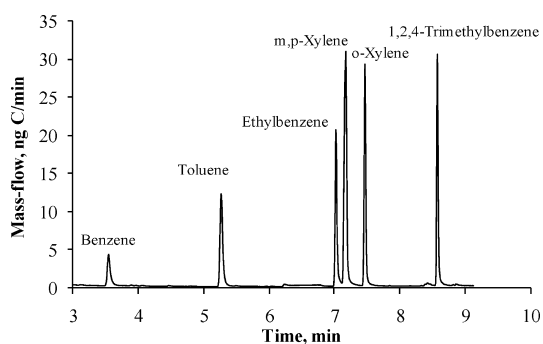


Figure 4. Mass flow chromatogram obtained for the mixture of BTEX and 1,2,4-trimethylbenzene in water using HS-SPME-GC-Combustion-MS and postcolumn addition of $^{13}\text{CO}_2$.

nately, the CAR/PDMS/DVB fiber generated broader peaks and tailing, resulting in lower signal-to-noise ratio and poorer precision in comparison with the PDMS/DVB fiber, which was finally selected for further experiments. In addition, the fiber/sample distribution constants (K_{fs}) were calculated for a more reliable comparison between the extraction efficiency of the fibers as it is a parameter related to the phase volume²³ (see Table SI-2 in the Supporting Information). The K_{fs} values obtained for the PDMS fiber were of the same order of those cited in the literature.¹⁹ Interestingly, K_{fs} values obtained for the PDMS/DVB fiber were significantly higher than those obtained for the CAR/PDMS/DVB fiber, in spite that both fibers provided very similar absolute recoveries (see Table 2). These results seem to indicate that the PDMS/DVB stationary phase showed higher affinity for the BTEX compounds. Notably, only nine analysis (three replicates per fiber tested) were necessary to obtain this valuable information in fundamental studies, critical to optimize new procedures of SPME.

As an example, Figure 4 shows the mass-flow chromatogram obtained using the PDMS/DVB fiber. In this case, together with the impressive preconcentration factor typically observed by SPME, the carbon background was significantly decreased (two or three times lower). The detection limits obtained using HS-SPME were in the low ng/L level (<10 pg/g) for all compounds assayed except for benzene (80 pg/g).

In order to provide internal validation of the proposed methodology for SPME analysis, a multiple extraction experiment was designed. To this end, a solution containing 20 ppb of BTEX was successively extracted using a PDMS/DVB fiber. Most of the BTEX can be completely extracted by SPME after a few extractions, so we have compared the values obtained by summing up the amount extracted in every single extraction with the total amount initially present in the standard solution in order to check the mass balances. The results are shown in Table SI-3 (Supporting Information). The extracted amounts (in ng) experimentally obtained after four consecutive extractions for all the compounds closely matched the amounts initially spiked to the water sample (recoveries ranging from 91 to 104%) validating the proposed approach. As expected, benzene could not be quantitatively extracted after 4 extractions since its absolute recovery for every single experiment hardly reached 20%.

(23) Pawliszyn, J. *Applications of Solid Phase Microextraction*, 1st ed.; RSC: United Kingdom, 1999.

Table 3. Absolute Amount of Compound Determined in Two Spiked Water Samples, Tap and River Water, using HS-SPME-GC-Combustion-MS and Post-Column Addition of $^{13}\text{CO}_2$ ^a

compound	tap water		river water	
	added (ng)	found (ng)	added (ng)	found (ng)
benzene	4.85	4.9 ± 0.4	5.16	4.9 ± 0.2
toluene	4.94	4.8 ± 0.1	5.26	5.1 ± 0.2
ethylbenzene	4.95	5.1 ± 0.2	5.27	5.6 ± 0.3
<i>m,p</i> -xylene	9.90	10.4 ± 0.2	10.54	11.7 ± 0.6
<i>o</i> -xylene	4.94	5.3 ± 0.1	5.24	5.2 ± 0.5

^a The uncertainty is expressed as the standard deviation for $n = 3$ replicates.

Finally, we evaluated if the absolute recoveries obtained in ultrapure water could be affected by matrix effects in real samples. For this purpose, a tap and a river water were analyzed for BTEX. None of the compounds were initially detected, so the samples were fortified with a methanolic solution to a final concentration of ~5 ng/g of each of the six compounds. Samples were extracted under the optimal conditions previously described and, in this case, 1,2,4-trimethylbenzene was used as the internal standard to allow for compensation of the well-known variability of the SPME technique. Quantitative results were obtained using the recoveries calculated from the standard solutions described before. Table 3 shows the final results obtained for two samples, tap and river water, respectively. As can be seen, recoveries can be considered quantitative with reproducibility RSD values lower than 10% in all cases. These results indicate that extraction efficiencies seem not to be affected by matrix components in natural water samples paving the way to the application of this online isotope dilution methodology to the direct and absolute quantification of BTEX in different water samples at ppb-ppt levels.

CONCLUSIONS

The postcolumn carbon-isotope dilution method described here allows for the accurate and precise quantification of different carbon-containing species eluted from the GC column, without the need for specific standards for each target analyte.¹⁵ Of course, the purity of each chromatographic peak will need to be confirmed by parallel qualitative GC-MS analysis. This is the first time that the generic quantification based on the postcolumn isotope dilution concept has been applied using a molecular-ion source (electron ionization). To make it possible, every carbon-containing compound analyzed had to be converted into the same species, CO_2 , by means of a combustion reactor placed after the chromatographic column prior to the continuous online mixing with the isotopically labeled compound, $^{13}\text{CO}_2$. In this way, it was guaranteed that natural and enriched compounds provided the same response at the molecule-specific detector. As a result, the generic postcolumn isotope dilution quantification, restricted so far to elemental ion sources and ICP-detectable elements, could be extended to molecular ion sources and organic compounds (containing exclusively C, H, N, and O). Notably this approach, which requires a simple low-cost modification of a standard GC-MS instrument, can be carried out without any loss of the structural information or compound-confirmation capabilities provided by current GC-MS equip-

ment. Therefore, the long-time dreamed of chromatographic detection allowing generic quantification and complete characterization of organic compounds in a single instrument is realized. In addition, the proposed method turned out to be very cost-effective because expenses associated with the use of isotopically labeled $^{13}\text{CO}_2$ are negligible and there is no need for external calibration, resulting in considerable savings in time and money (e.g., cost of analytical standards). Beyond its potential use for quantitative quality control in a wide range of standard laboratories (e.g., environmental ones), a powerful application of our approach can be foreseen in oil-spill fingerprinting and in pharmaceutical analysis, for which the number of target organic analytes is increasing exponentially (so it is virtually impossible to have standards for each compound, even if they exist).

In addition, the unique compound-independent calibration capabilities of the approach proposed could be advantageously exploited for the assessment of sample introduction procedures in GC. In the present work, we have selected HS-SPME to illustrate this promising ability of our approach. Quantitative data obtained for BTEX compounds in different water samples have demonstrated that quantitative assessment of HS-SPME procedures in terms of absolute absorption yields is successful (the analytical features of different fiber coatings could be evaluated and critically compared in this way), opening its use to assess the performance of many other reported sample preparation and preconcentration methods.

ACKNOWLEDGMENT

Financial support was provided by the Spanish Ministry of Education (CTQ2006-05722) and FICYT (PC06-016) and technical support by KONIK-TECH. J.R.E. acknowledges the MEC (European Social Fund) for a Ramon y Cajal contract, and S.C.D. acknowledges the FICYT for a PhD grant.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

The mass spectrum obtained for the mass range 43–47 when 1 mL/min of the spike flow was introduced directly to the ion source (Figure SI-1). The optimization of the integration time for the 44/45 isotope ratio measurement (Figure SI-2). The short term (30 min) and long term (9 h) stability of the $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$ isotope ratio (Figures SI-3 and SI-4, respectively). The quantification results of a mixture of different families of compounds containing saturated, unsaturated and functionalized compounds (Table SI-1). The K_{fs} values obtained for reliable comparison between the different fibers used (Table SI-2). The multiple headspace experiment carried out for internal validation of the approach, comparing the sum of the amount obtained in each single extraction to the total amount initially present in the spiked solution (Table SI-3). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

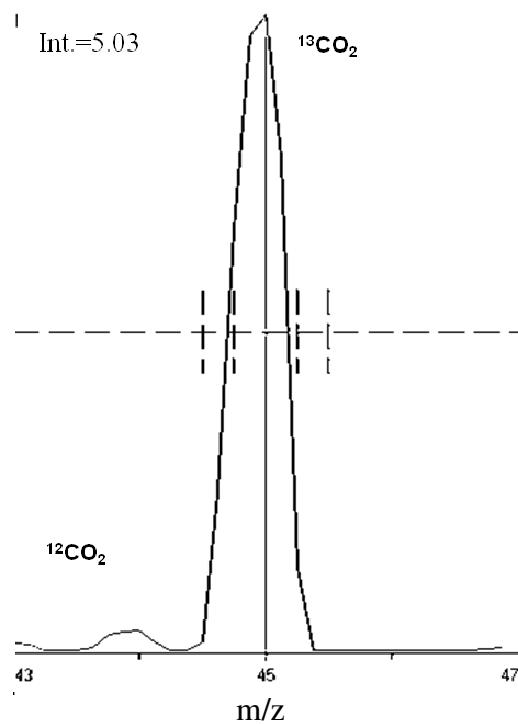
Received for review April 12, 2010. Accepted July 2, 2010.
AC101103N

1 SUPPORTING INFORMATION

2

3 FIGURE SI-1: Mass spectrum obtained for the $^{13}\text{CO}_2$ spike flow.

4



5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

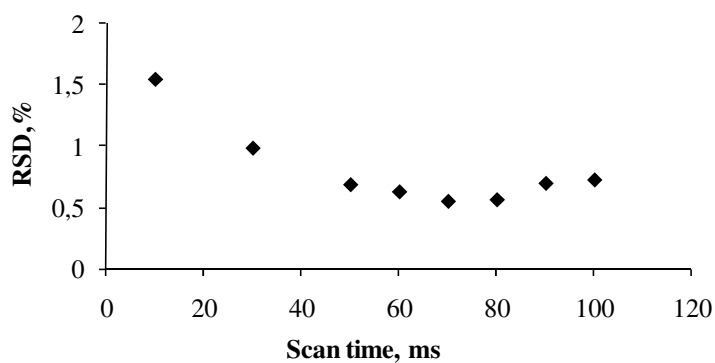
19 **Selection of the integration time.**

20 The optimum integration time at masses 44 and 45 was studied. If we take into account that
21 peak widths in our GC-MS system are around 2 seconds and we need at least 10 points to
22 properly define the peak profile, the maximum integration time allowed will be 100 ms per
23 mass. Of course, if we increase peak definition we will decrease counting statistics and a
24 compromise must be found. Thus, integration time was varied from 10 to 100 ms and the
25 isotope ratio precision was in each case evaluated. Figure SI-1 shows the results obtained.
26 As expected, the precision improved as the integration time increased from 10 to 50 ms.
27 However, higher integration times did not provide lower RSD values as precision remained
28 roughly constant (approximately 0.5% RSD) in the range 50-100 ms. An integration time of 70
29 ms was finally selected considering both a good precision in the ratio measurement and an
30 adequate number of points per chromatographic peak (≈ 15) to obtain well defined peak
31 profiles.

32

33 FIGURE SI-2:

34



35

36

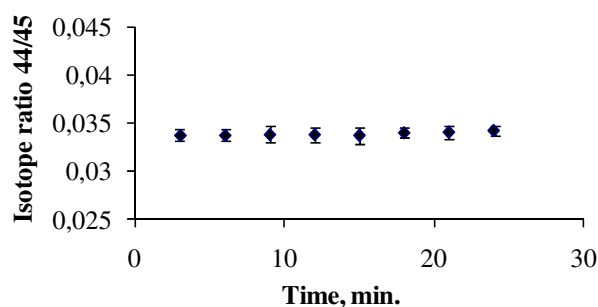
37

38 **Stability of the $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$ isotope ratio.**

39 The stability of the $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ isotope ratio was checked both in the short term (30 min,
40 approximately the time of a typical analysis by GC-MS) and in the long term (9 hours, a whole
41 working day). Results are shown in Figures SI-3 and SI-4, respectively. In both cases the
42 measured isotope ratios, 0.0339 ± 0.0002 and 0.034 ± 0.001 ($n=8$), respectively, were
43 remarkably stable. Similar results were obtained in different days indicating that the
44 instrument is robust enough for routine analysis. It is worth mentioning that, assuming a
45 typical tracer carrier flow rate of 0.5 mL min^{-1} , the number of working hours per container was
46 about 800. Taking into consideration the price of the solid $\text{Na}_2^{13}\text{CO}_3$ used (180 \$ per 5 g), and
47 the small amount of this compound required to fill each container, the operational cost derived
48 from the use of the enriched spike turned out to be extremely low ($0.01 \text{ \$ h}^{-1}$).

49

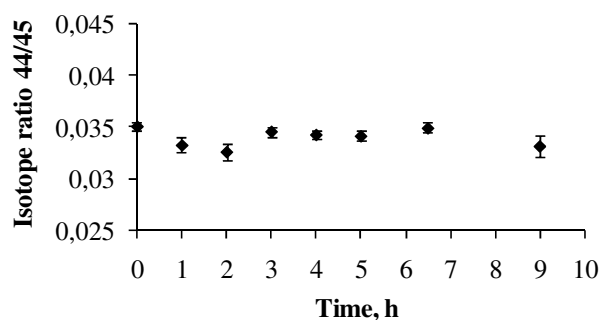
50 FIGURE SI-3:



51

52 FIGURE SI-4:

53



54

55 **Analysis of a model mixture.**

56 In order to evaluate the suitability of the procedure for other organic compounds a model
57 mixture containing saturated (undecane, tridecane, tetradecane and pentadecane),
58 unsaturated (toluene, ethylbenzene and *o,m,p*-xylene) and functionalized (butyl butyrate and
59 hexyl butanoate) standards was analyzed, using again tetradecane as the only internal
60 standard. The results obtained are given in Table SI-1. The recoveries for the different
61 compounds agreed very well with the expected values, varying from 93 to 106%, while the
62 precision obtained ranged between 4 to 6% RSD.

63

64 TABLE SI-1: Absolute quantification results for the mixture of organic compounds (saturated,
65 unsaturated and functionalised). Tetradecane was used as an internal standard. The
66 uncertainty is expressed as the standard deviation for n=5 injections

67

68

Compound	Added ($\mu\text{g/g}$)	Found ($\mu\text{g/g}$)
Toluene	5.6	5.2 ± 0.3
Ethylbenzene	5.6	5.4 ± 0.3
<i>o,m</i> -xylene	11.2	11.1 ± 0.6
<i>p</i> -xylene	5.6	5.6 ± 0.3
Butyl Butyrate	3.8	3.9 ± 0.2
Undecane	4.0	4.2 ± 0.2
Butyl Hexanoate	3.9	3.9 ± 0.1
Tridecane	4.3	4.5 ± 0.1
Tetradecane	4.2	I.S.
Pentadecane	4.2	4.0 ± 0.2

69

70

71

72 **Values of the fiber/sample distribution constants (K_{fs})**

73 These values were calculated for a more reliable comparison between the extraction
 74 efficiency of the fibers since each fiber has different phase thickness and this fact is taken into
 75 account when computing K_{fs} .

76

77 TABLE SI-2:

78

Compound	K_{fs} values		
	PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS/DVB
Benzene	170 ± 10	3800 ± 100	5700 ± 400
Toluene	430 ± 40	10200 ± 50	9200 ± 500
Ethylbenzene	900 ± 100	11380 ± 40	9400 ± 400
m,p-xylene	1000 ± 100	11960 ± 80	10500 ± 500
o-xylene	1400 ± 100	14100 ± 300	12200 ± 400
Trimethylbenzene	2500 ± 400	12900 ± 800	10700 ± 300

79

80 **Multiple SPME experiments.**

81

82 TABLE SI-3: Absolute amount of compound determined in four successive extractions from
83 the same spiked solution. Global recovery is computed as the ratio of the sum of ng of
84 compound extracted in each individual SPME experiment to the ng originally spiked to the
85 solution.

86

87

Compound	Added (ng)	Found in successive extractions (ng)				Total Recovery (%)
		1 st	2 nd	3 rd	4 th	
Benzene	151.7	27.7	21.8	14.9	16.7	58
Toluene	154.6	80.9	34.5	11.3	6.9	95
Ethylbenzene	154.9	102.1	20.5	4.5	3.0	93
m,p-Xylene	309.9	203.1	40.1	9.1	6.9	92
o-Xylene	154.6	125.9	25.2	4.9	3.5	104
1,2,4-Trimethylbenzene	158.2	109.7	11.5	3.5	3.9	91

88

89

**D.2. DESARROLLO Y OPTIMIZACIÓN DE UN SISTEMA
GENÉRICO DE CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS
ORGÁNICOS SOLUBLES EN AGUA MEDIANTE FIA/HPLC-
oxidación-MS y DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA DE ¹³C**

**D.2.1 Optimización y validación de un sistema de análisis por inyección en flujo
para la cuantificación de CO₂ en disolución por dilución isotópica en línea de ¹³C**

D.2.1.1 Artículo Científico III: Anal. Bional. Chem. 2012, 402, 91-97

*“Towards compound-independent calibration for organic compounds using online
isotope dilution mass spectrometry”*

***Autores:** Sergio Cueto Díaz, Jorge Ruiz Encinar, Alfredo Sanz Medel, José Ignacio
García Alonso*

Towards compound-independent calibration for organic compounds using online isotope dilution mass spectrometry

Sergio Cueto Díaz · Jorge Ruiz Encinar ·
Alfredo Sanz-Medel · José Ignacio García Alonso

Received: 15 July 2011 / Revised: 15 September 2011 / Accepted: 29 September 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) can be considered a primary measurement method directly traceable to the International System of Units (SI). This measurement technique is increasingly employed in routine laboratories, owing to its unequalled analytical performance, precision and ease of accreditation. Unfortunately, for the adequate application of IDMS, several isotopically labelled standards, corresponding to the compounds of interest, are required. Additionally, when the enriched isotope is continuously added after a chromatographic separation, and an elemental ion source is used, it allows quantification of the different analytes being eluted from the column without requiring specific standards for each compound (online IDMS). In this article, we discuss how the traditional applicability of online IDMS for elemental speciation can be dramatically expanded by using carbon isotope tracers, oxidation or combustion reactions and a conventional molecular ion source. With such a strategy every carbon-containing compound being eluted from a chromatography system can be quantified without the need for specific standards as long as quantitative combustion/oxidation and complete elution occur. So far, only gas chromatography–combustion–mass spectrometry applications have been described, but recent results indicate the great possibilities of extending this novel approach to the quantifica-

tion of organic compounds after separation by liquid chromatography.

Keywords Isotope dilution mass spectrometry · Compound-independent calibration · Organic compounds · Chromatography

Introduction

Chromatographic techniques are one of the most powerful tools available in analytical chemistry when the determination of individual compound in mixtures is required. Gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC) instruments are widespread and are basic instrumentation in practically every research or routine laboratory, being essential tools in the food, pharmaceutical, clinical and environmental fields, among others. Unfortunately, accurate quantitative analyses performed through the chromatographic techniques require the use of calibration plots prepared from specific standards for each analyte of interest, as the vast majority of detectors that can be coupled to a chromatography system cannot provide a truly universal compound-independent response [1]. The time-consuming calibration procedures required to obtain quantitative data stand in clear contradiction with the needs for fast, robust, high-throughput methods of the above-mentioned fields of application. In this article, we discuss a novel approach for the generic quantification of organic compounds without the need for calibration procedures using specific standards. The method is based on the concept of online isotope dilution mass spectrometry (IDMS), which was first developed for speciation analysis using inductively coupled plasma (ICP) mass spectrometry (MS) instrumentation.

Published in the *10th Anniversary Issue*.

S. C. Díaz · J. R. Encinar · A. Sanz-Medel · J. I. G. Alonso (✉)
Department of Physical and Analytical Chemistry,
University of Oviedo,
Julián Clavería 8,
33006 Oviedo, Spain
e-mail: jiga@uniovi.es

Published online: 14 October 2011

 Springer

Overview

Compound-independent calibration (CIC) strategies are usually based on the capabilities of some elemental detectors to provide an identical response for a particular element regardless of its chemical form. Thus, a single generic compound containing the element to be measured can be used as a standard for quantification of any other species containing the element of interest. The first approaches in this line involved the coupling of a gas chromatograph with a microwave-induced plasma and atomic emission detection system. This coupling was successfully applied, in addition to metal speciation studies [2], to the compound-independent quantification of a number of different families of organic species such as halogenated compounds [3], sulfur-containing polycyclic aromatic hydrocarbons [4] and nitrogen-containing compounds [5]. Later, research focused on the use of the more robust and sensitive ICP as an ion source for MS detection. Since then, ICP-MS has been coupled with both GC and high-performance LC (HPLC), and has shown compound-independent sensitivity for different elements [6, 7].

The exceptional CIC capabilities of ICP-MS as a detection system were greatly increased when Rottmann and Heumann [8], described for the first time the use of online IDMS for real-time and standardless quantification. The procedure consists of the continuous addition of a compound (spike) containing an enriched isotope of the element of interest, just after the chromatographic separation. The isotope ratio between the most abundant natural isotope (coming from the analytes) and the enriched one added after the column (coming from the spike) is continuously measured by ICP-MS. When this isotope ratio is introduced into the online isotope dilution equation [8], the result obtained is a mass-flow chromatogram in which the y -axis represents the mass flow, that is the amount of element being eluted per unit time. Figure 1 shows an example of the whole conversion from the signal intensities provided by the instrument to the “mass-flow chromatogram” for the determination of sulfur-containing compounds in vacuum gas oil BCR 107 [9]. Note that there is an error in the y -axis label in Fig 1c in the original publication. The units should be nanograms per minute (mass flow) and not nanograms per gram (amount fraction). The integration of each peak in this mass-flow chromatogram provides the absolute amount (nanograms) of the element that is eluted in each single peak, and this can be easily related to the absolute amount of compound if its chemical structure is known. In addition, the signal measured is relative and thus factors involving changes in the sensitivity such as signal drift, matrix interferences and gradients in HPLC are internally corrected [10]. The only requirement to be met is that the instrumental response

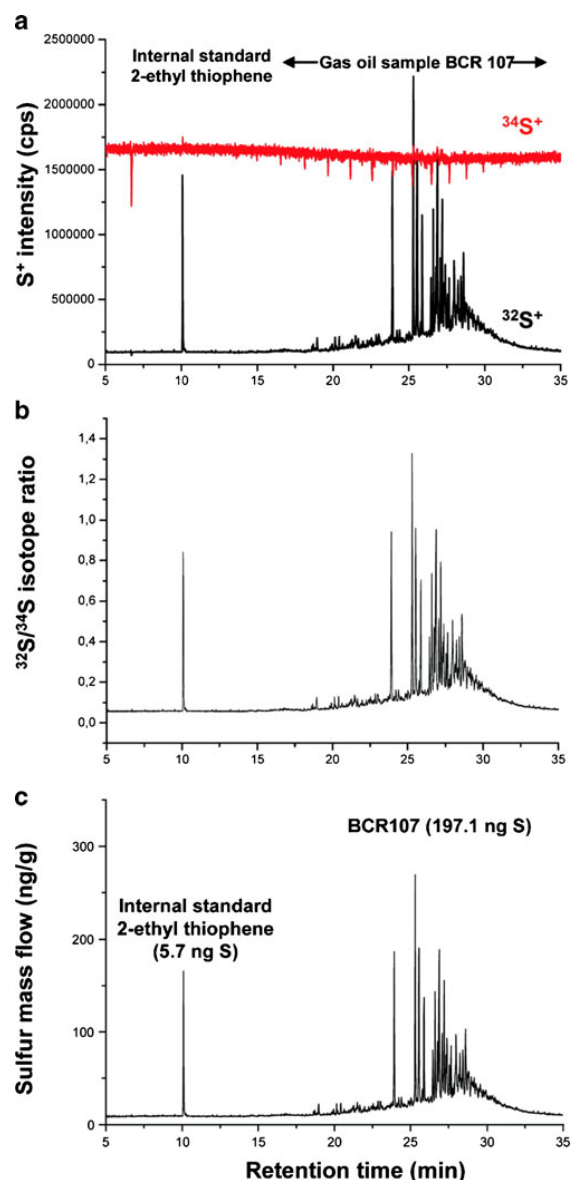


Fig. 1 Example of the process to convert the signal intensities provided by the instrument into mass flow for vacuum gas oil BCR 107. **a** The signals obtained at m/z 32 for natural-abundance sulfur, corresponding to the analytes and m/z 34 (in red), corresponding to the ³⁴S-enriched spike. **b** The isotope ratio chromatogram and **c** the mass flow chromatogram. (Reproduced with permission from [9]. Copyright 2008, American Chemical Society)

must be independent of the chemical form of the species under analysis, including the spike, which can be easily guaranteed when an ICP is used as the ion source [11]. This approach has been widely employed in trace element speciation [12, 13], and has been demonstrated to be a

very useful tool in quantitative metalloproteomics [14] as well as in the quantification of small biomolecules [10] or for metabolic studies employing stable isotopes [15]. The vast majority of the applications developed so far have resorted to HPLC as the separation technique. A point of concern with all these HPLC–isotope dilution–ICP–MS applications relates to the evaluation of column recovery or possible species degradation inside the column. It must be stressed that online IDMS only computes what is being eluted from the column; therefore, losses of analyte prior to or during separation may lead to significant errors [14].

In the field of GC, Heilmann and Heumann [9] developed a remarkable GC–isotope dilution–ICP–MS method for the quantification of sulfur-containing compounds in petroleum derivatives. In this original work, ^{34}S -enriched dimethyl sulfide was used as a postcolumn “gas-phase” spike and a sulfur-containing internal standard of known concentration was added to the samples to calibrate the gaseous spike mass flow. The method was validated for the quantification of total sulfur and thiophenes in petroleum products and was proposed even as a fast routine method. Despite the great potential of the isotope dilution–ICP–MS procedure in combination with chromatographic techniques, there are some limitations. Clearly the species subjected to analysis must have an “ICP-detectable” element in their structure. Elements such as carbon, nitrogen, hydrogen and oxygen are hardly detected owing to their high ionization potentials and the high signal background for these elements in the ICP. This fact clearly limits the range of applications of this method and excludes the analysis of organic compounds containing only carbon, nitrogen, hydrogen and oxygen. Only two attempts at ICP–MS quantification of organic compounds by measuring carbon have been described so far [16, 17] using HPLC separations. In both cases, the limits of detection were significantly high in comparison with the usual performance of the ICP for other elements. There is another possibility for applying this online IDMS procedure for compounds containing no ICP–MS-detectable elements. Isotope equilibration can also be achieved by converting all chemical compounds separated during the chromatography and the postcolumn spike into a single compound which can be detected by MS. Online oxidation and combustion reactions, currently being developed for compound-specific isotope ratio MS, convert all organic

compounds being eluted from a chromatography system into carbon dioxide. The postcolumn addition of ^{13}C -labelled carbon dioxide in combination with combustion reactors has been described for GC [18, 19] and will be discussed first.

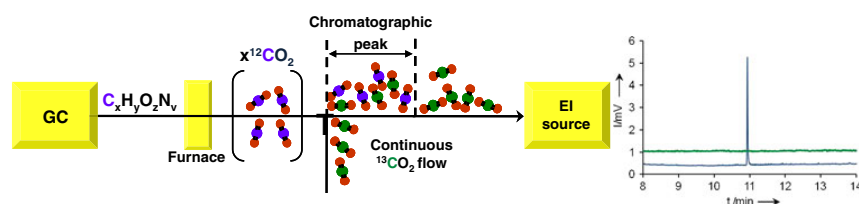
Applications

GC–combustion–MS and online addition of ^{13}C CO_2 as a CIC method for the quantification of organic compounds in the gas phase

GC–electron ionization (EI)–MS is one of the most widely used techniques for identification and quantification of organic compounds [20]. Its versatility, selectivity, low operational cost and high sensitivity make this technique invaluable in qualitative and quantitative organic analysis, being established as the technique of choice in a large number of official methods [21]. Obviously, this selectivity and structure elucidation ability brings as a consequence a strong species-dependent response (two compounds with different structures and/or chemical properties will give significantly different signal intensities in the detector) and, therefore, again specific standards are necessary to perform accurate quantitative analysis. A single instrument combining both the separation and the compound identification capabilities of a GC–MS system with a molecular ion source (EI) and the unique quantitative potential of the compound-independent detectors mentioned before could establish itself as the detector of choice in modern analytical chemistry.

We recently described the basis of a CIC system in GC combining the above-mentioned advantages [18, 19]. A schematic diagram of the procedure is shown in Fig. 2. The system is based on the quantitative conversion of every organic compound into CO_2 after their chromatographic separation using a combustion reactor and the online addition of a constant flow of ^{13}C -enriched CO_2 diluted in helium (the carrier gas typically used in GC–MS). In the mass spectrometer, the $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ isotope ratio is obtained by measuring the signals at m/z 44 and m/z 45, corresponding to $^{12}\text{CO}_2^+$ and $^{13}\text{CO}_2^+$, respectively. The contribution of ^{17}O (0.038%) at mass 45 can be considered negligible. As the only species to be finally measured is CO_2 , the

Fig. 2 The step-by-step process of the postcolumn isotope dilution approach. GC gas chromatograph, EI electron ionization



necessary requisite of a compound-independent response in online IDMS is fulfilled no matter what the ionization source employed. In this case, a high-vacuum source as EI is expected to give a much better limit of detection for carbon than the ICP.

To apply this approach we used a quadrupole GC-MS system with an EI source. Some simple modifications of the instrument were necessary to apply this procedure. The instrument was fitted with a homemade tubular furnace (0.5-mm inner diameter) for quantitative combustion and transformation of the analytes into CO_2 , a 5-L stainless steel container equipped with a mass-flow controller to supply accurately the spike flow (0.5 mL $^{13}\text{CO}_2$ in helium per minute) and a six-way valve. This valve prevents the solvent from entering the combustion unit, which would shorten its useful life and, more importantly, allows it to bypass the combustion oven when necessary, leading the column effluent directly to the EI source for compound identification or peak purity confirmation [18, 19]. Figure 3 shows a scheme of the instrument developed, including two pictures corresponding to the combustion furnace and the six-way valve mounted inside the oven of the chromatograph. Some relevant characteristics of this system are as follows: first, no specific standards for each analyte are necessary for quantitation; second, quantitation is based on

the measurement of carbon (as CO_2), so it could be considered “universal” for organic compounds; finally, the instrument is versatile as it maintains the capabilities for structure elucidation of a conventional GC-(EI)MS system when the combustion oven is bypassed.

The proof of concept was demonstrated for the analysis of model mixtures of different families of organic compounds (*n*-alkanes as saturated compounds, benzene, toluene, ethylbenzene and xylene as unsaturated and esters as functionalized compounds) [18]. To prove the robustness of the set-up, a diesel fuel sample was directly injected after appropriate dilution in *n*-hexane. Major components of the sample were identified by their EI spectra and in a consecutive analysis were quantified by postcolumn isotope dilution. Only a turn of the valve was necessary to change between the “qualitative” configuration (conventional GC-MS) to identify the species present in the sample, and the “quantitative” configuration (GC-combustion-MS and postcolumn isotope dilution) to quantify them in a subsequent analysis [18]. Although the GC-combustion-MS and postcolumn isotope dilution approach is still in a very early stage of development, its potential suggests a number of possible applications could be developed soon. Apart from its direct use in routine quantitative analysis, the method presented could be a very useful tool in the

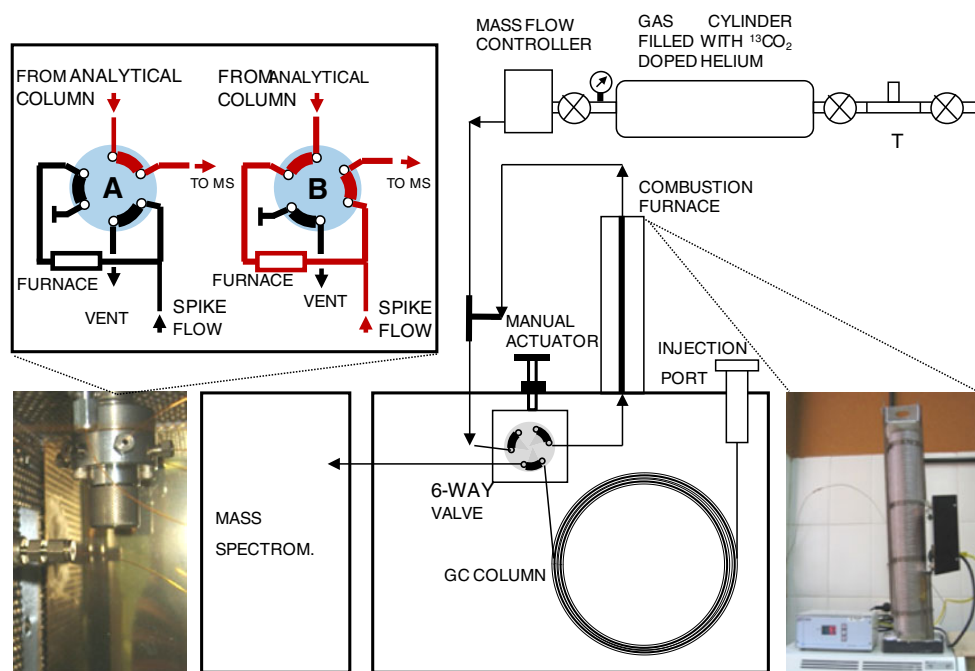


Fig. 3 The carbon postcolumn isotope dilution system for quantification of organic compounds in the gas phase. The six-way valve mounted inside the oven (left) and the combustion furnace with its temperature controller (right) are shown. The two possible configurations

of the set-up are shown in the inset: *A* for compound identification (gas chromatography–electron ionization–mass spectrometry) and *B* for compound-independent calibration by postcolumn isotope dilution. *GC* gas chromatograph, *MS* mass spectrometer

quantitative study of non-quantitative processes commonly employed during the usual analytical sample treatment steps, such as liquid–liquid extraction, preconcentration using solid-phase extraction cartridges or in the optimization of solid-phase microextraction procedures [19]. Interestingly, only one analysis is required to determine the amount of compound extracted, and therefore the absolute recovery of the process is obtained directly, allowing the quantitative and reliable optimization of these procedures in a fast and simple way.

Flow injection analysis–oxidation–MS and online addition of $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ as a CIC method for the quantification of organic compounds in the liquid phase

Once the concept had been validated for organic species present in the gas phase, a similar determination procedure in the aqueous phase was attempted. For the study and optimization of the online IDMS procedure, a flow injection system was first constructed (i.e. no separation column was employed). As before, the target “natural abundance” analyte and the “isotopically labelled” spike need to be converted into the same compound before reaching the molecular ion source in order to achieve isotopic equilibrium.

As a first proof of concept, we evaluated the persulfate oxidation reaction in acidic medium at 99 °C typically employed in compound-specific isotope analysis by isotope ratio MS [22]. Thus, our approach again consisted in the chemical transformation of all target organic compounds, together with the enriched tracer, into CO_2 by wet oxidation and its subsequent extraction into a helium gas stream by

means of a gas-permeable membrane. Such helium flow, containing the natural-abundance and isotopically enriched CO_2 , was first dried in a Nafion membrane and then taken into the EI source for carbon isotope ratio measurement. The whole experimental set-up is shown in Fig. 4. A carrier flow of liquid water takes the injected sample to a T piece, where it is mixed with a constant flow of $\text{HNa}^{13}\text{CO}_3$. After mixing, a further flow of phosphoric acid and sodium persulfate will form CO_2 (after heating at 99 °C), which is extracted to a flow of helium gas using a gas-permeable membrane. The blend of natural-abundance and enriched CO_2 is then taken to the mass spectrometer, where the 44/45 isotope ratio is measured as a function of time. For traceability purposes, the calibration of the ^{13}C postcolumn mass flow was performed by injecting either a natural-abundance sodium carbonate primary standard or potassium hydrogen phthalate primary standard. It is worth stressing that both primary standards can be used as generic standards for any organic compound.

The liquid flow injection analysis (FIA) procedure was first evaluated using natural-abundance sodium carbonate in water without the persulfate oxidation. The mass-flow FIagrams obtained showed excellent precision and good linearity over the concentration range assayed (more than 2 orders of magnitude). Again, the main characteristic of the FIagrams obtained is that the integration of each peak provided directly the mass of carbon present in that peak. So, the area of each peak has the units of mass of carbon. For validation purposes, a sample of seawater containing a certified amount of dissolved inorganic carbon was analyzed (certified reference material standard, supplied by Andrew Dickson, Scripps

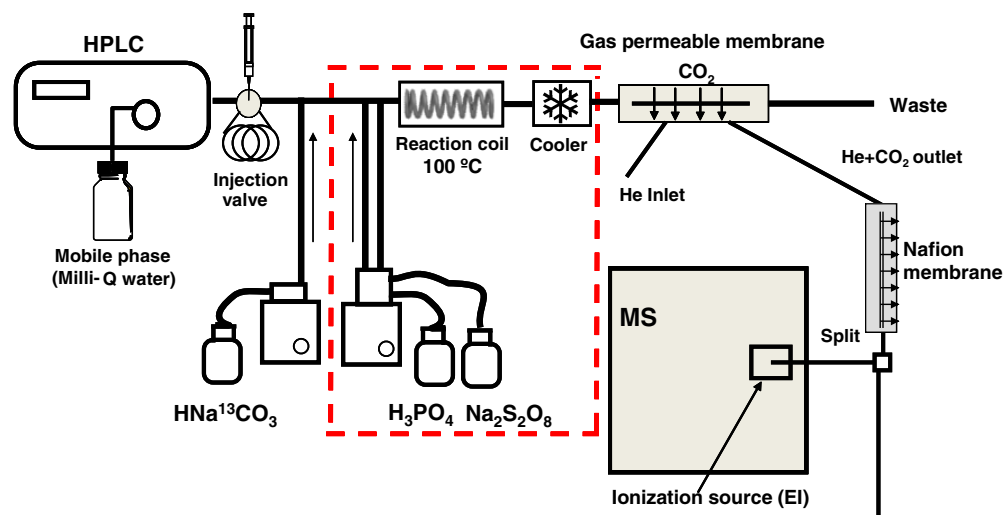


Fig. 4 The carbon online isotope dilution system for quantification in the liquid phase. The dotted red box highlights the specific oxidation set-up required to convert any organic compound into CO_2 . EI

electron ionization, HPLC high-performance liquid chromatograph, MS mass spectrometer

Institution of Oceanography). The flow of the spike was determined by reverse IDMS using a natural-abundance sodium carbonate primary standard as a reference. The mass-flow results for a quintuplicate injection of the sample (24.19 ± 0.19 ppm, as carbon) were in perfect agreement with the certified value (24.16 ppm). As expected, the precision obtained was excellent, with relative standard deviation below 1%. For the extension of the idea to the determination of pure organic compounds in the aqueous phase, the oxidation step was implemented to guarantee equilibration of carbon isotopes. The specific set-up used for wet oxidation is shown in the dotted red box in Fig. 4. For the calibration of the online spike flow, in this case we resorted to injections of potassium hydrogen phthalate (99.98% purity). Since it is a primary standard as well, the results will still be directly traceable to the SI. For evaluation purposes, a sucrose standard (more than 99% purity) was analysed first. A typical FIAGram for increasing concentrations of sucrose (five injections each) is shown in Fig. 5, where the first five peaks correspond to the phthalate standard used to calibrate the spike mass flow. The calibration was linear ($R^2=0.9999$) within the whole range studied up to a concentration of $85 \mu\text{g/g}$ carbon. Again, excellent precision and agreement between the experimental and the expected values were obtained (43.1 ± 0.6 ppm C found vs. 43.3 ppm C theoretical, respectively).

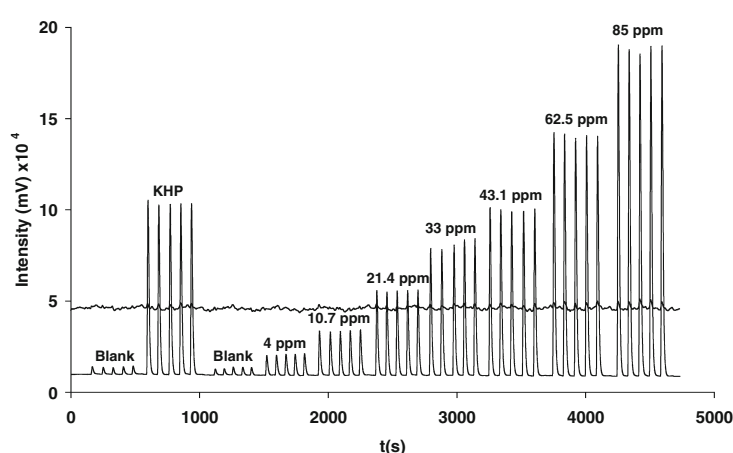
Outlook

Organic pure substance materials are required in many different fields of analysis, including environmental, food, clinical, pharmaceutical, drugs of abuse and forensic samples. In this context, well-characterized materials are required for the establishment of traceable calibration solutions or direct assay standards. Therefore, the availability of reliable methods for the characterization of pure

materials such as those described here could play a very important role in the establishment of a system of SI-traceable chemical measurement results. This application could be extremely useful for the purity assessment of new synthetic compounds (pharmaceuticals or peptides) where certified standards are not available. For that purpose, we need to resort to HPLC–oxidation–MS with online isotope dilution for the separation of the main compound and its impurities. It is obvious that 100% aqueous mobile phases will be mandatory, as any small amount of organic modifier will result in an unacceptable carbon background, hampering a reliable detection of the analytes. Moreover, HPLC separations using only water as the mobile phase are limited to a narrow range of polar compounds (sugars, amino acids, etc.). However, we can envisage that advances in methods, stationary phases and instrumentation [23] will certainly expand applications of this new promising concept and technique to most of the known organic compounds, independently of their volatility or thermal stability.

Of course, as mentioned in “Overview”, every post-column isotope dilution approach only quantifies what comes out from the column; therefore, any losses, incomplete recoveries or compound degradation occurring during the chromatographic step will critically affect the quantitative results obtained. Therefore, these issues must be taken into account when applying the novel approach proposed in this article if accurate results (traceable to the SI) are sought. In this context and regarding the quantification of organic compounds in the gas phase, special attention must be paid to transfer of the compounds in the GC injector because the recoveries from the column are quantitative if no thermal degradation is taking place. Therefore, splitless, temperature programmed or on-column injection modes are preferred. With respect to the quantification of organic compounds in the liquid phase, quantitative injection into the LC system is ensured but recovery from the column for

Fig. 5 Linearity, precision and accuracy evaluation of the online isotope dilution system in the liquid phase using sucrose. Potassium hydrogen phthalate (KHP) was used as a compound-independent (primary) standard. Five injections each were performed for the blank and increasing sucrose concentrations (from 4 to 85 ppm as carbon)



highly retained species cannot be quantitative. Therefore, the LC approach should be preferably applied to small, hydrophilic compounds (e.g. sugars, amino acids, small peptides). It is interesting to note that species degradation affecting the accuracy of the results in postcolumn isotope dilution using ICP-MS detection usually involves the breakage of the bond between the metal and the organic moiety of the biomolecule owing to undesired interactions occurring inside the column. Fortunately, this negative effect will not take place in the case of small organic molecules, as the quantification target is the organic moiety and breakage of the C–C bonds is not likely to occur inside standard LC columns. Of course, the generic character of the approach makes it also very promising for the study of degradation reactions during chromatographic separations or for the fast quantitative screening of organic compounds in complex samples with a certain level of uncertainty.

References

1. Zhang B, Li X, Yan B (2008) *Anal Bioanal Chem* 390:299–301
2. Pereiro IR, Diaz C (2002) *Anal Bioanal Chem* 372:74–90
3. Hjelm O, Boren H, Öberg G (1996) *Chemosphere* 32:1719–1728
4. Becker G, Nilsson U, Colmsjö A, Östman C (1998) *J Chromatogr A* 826:57–66
5. Wivel P, Knudsen K, Zeuthen P, Whitehurst D (2000) *Ind Eng Chem Res* 39:533–540
6. González A, Marchante-Gayón JM, Alonso JIG (2007) *J Anal At Spectrom* 22:1138–1144
7. Pereira A, Encinar JR, Sanz-Medel A (2007) *Angew Chem Int Ed* 46:569–571
8. Rottmann L, Heumann KG (1994) *Fresenius J Anal Chem* 350:221–227
9. Heilmann J, Heumann KG (2008) *Anal Chem* 80:1952–1961
10. Giner J, Moreno F, Herrero P, Santamaria-Fernández R, Marchante-Gayón JM, Alonso JIG (2010) *J Anal At Spectrom* 25:989–997
11. Schwarz A, Heumann KG (2002) *Anal Bioanal Chem* 374:212–219
12. Rodríguez-González P, Alonso JIG (2010) *J Anal At Spectrom* 25:239–259
13. Rodríguez-González P, Marchante-Gayón JM, Alonso JIG, Sanz-Medel A (2005) *Spectrochim Acta B* 60:151–207
14. Sarmiento A, Encinar JR, Cantanero A, Marchante-Gayón JM, Sanz-Medel A (2008) *Anal Chem* 80:8702–8711
15. Suzuki KT, Itoh M (1997) *J Chromatogr B* 692:15–22
16. Vogl J, Heumann KG (1998) *Anal Chem* 70:2038–2043
17. Smith C, Jensen BP, Wilson ID, Abou-Shakra F, Crowther D (2004) *Rapid Commun Mass Spectrom* 18:1487–1492
18. Díaz SC, Encinar JR, Sanz-Medel A, Alonso JIG (2009) *Angew Chem Int Ed* 48:2561–2564
19. Díaz SC, Encinar JR, Sanz-Medel A, Alonso JIG (2010) *Anal Chem* 82:6862–6869
20. Sneddon J, Masuran S, Richert JC (2007) *Anal Lett* 40:1003–1012
21. Keith LH (1996) *Compilation of EPA's sampling and analysis methods*, 2nd edn. CRC, Boca Raton
22. Krumenn M, Hilker AW, Juchelka D, Duhr A, Schlüter HJ, Pesch R (2004) *Rapid Commun Mass Spectrom* 18:2260–2266
23. Smith RM (2008) *J Chromatogr A* 1184:441–445

D.2.2 Desarrollo y optimización de un sistema FIA/HPLC-oxidación-MS y dilución isotópica en línea de ^{13}C para la cuantificación de compuestos orgánicos solubles en agua

D.2.2.1 Artículo científico IV: Anal. Chem. 2013, 85, 1873-1879

“Liquid chromatography, chemical oxidation and online carbon isotope dilution mass spectrometry as a universal quantification system for non-volatile organic compounds”

***Autores:** Sergio Cueto Díaz, Jorge Ruiz Encinar, Alfredo Sanz Medel, José Ignacio García Alonso*

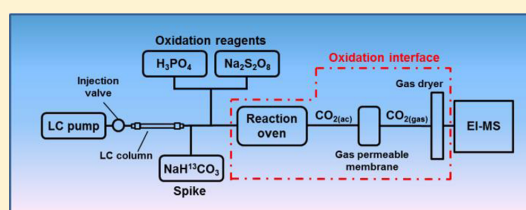
Liquid Chromatography, Chemical Oxidation, and Online Carbon Isotope Dilution Mass Spectrometry as a Universal Quantification System for Nonvolatile Organic Compounds

Sergio Cueto Díaz, Jorge Ruiz Encinar,* Alfredo Sanz-Medel, and J. Ignacio García Alonso*

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

ABSTRACT: A procedure for the universal detection and quantification of polar organic compounds separated by liquid chromatography (LC) based on postcolumn carbon isotope dilution mass spectrometry (IDMS) was developed. The eluent from the LC column is mixed online with a continuous flow of ^{13}C -enriched sodium bicarbonate, and the sodium persulfate oxidation reaction in acidic media is employed to achieve isotope equilibration. All carbon-containing compounds eluting from the column are oxidized to $^{12}\text{CO}_2$ and $^{13}\text{CO}_2$, respectively, and the carbon dioxide is separated from

the aqueous phase using a gas-permeable membrane. The gaseous carbon dioxide is then carried to the mass spectrometer for isotope ratio measurements. Different water-soluble organic compounds were evaluated using a flow injection configuration to assess the efficiency of the oxidation process. Most water-soluble organic compounds tested showed quantitative oxidation. However, chemical structures involving conjugated $\text{C}=\text{N}$ double bonds and guanidinium-like structures were found to be resistant to the oxidation and were further studied. For this purpose, $^{13}\text{C}_1$ -labeled creatine (with the isotopic label in the guanidinium group) was employed as model compound. Specific conditions for the quantitative oxidation of these compounds required lower flow rates and the addition of metallic catalysts. This novel approach was tested as a universal detection and quantification system for LC. A simple standard mixture of four amino acids was separated under 100% aqueous conditions and quantified without the need for specific standards with good accuracy and precision using potassium hydrogen phthalate as internal standard. The main field of application of the developed method is for the purity assessment of organic standards with direct traceability to the International System of Units (SI).



Rubber, plastics, fuel, pharmaceuticals, cosmetics, detergents, coatings, dyestuffs, and agrochemical industries depend on a number of currently existing organic compounds and the continuous synthesis of new ones. Such number is huge (more than 13.5 million characterized compounds).¹ In fact, the continuously increasing size of virtual organic chemistry space accessible using known synthetic organic routes is estimated to be between 10^{20} and 10^{24} compounds.² It is therefore evident that it is virtually impossible to produce analytical standards for the determination of all these compounds in different samples. During the last 2 decades, mass spectrometry, usually coupled to gas (GC/MS) or liquid chromatography (LC), has established itself as the technique of choice for the identification and determination of the absolute or relative amounts of pure and mixed organic compounds.³ Unfortunately, the reliable quantification of these organic molecules can only be performed when certified specific standards for each analyte of interest exist.⁴ It is well-known that the purity assessment of solid organic standards is difficult and time-consuming. Typically, the purity assessment of organic calibrators can be carried out by two different approaches. The indirect method involves the determination of the mole or mass fraction of all the existing impurities in the material using a number of different techniques (GC-FID, LC-

UV, Karl Fischer titration, ashing, ...).⁵ The purity of the principal component is calculated by difference to the total mass. This is obviously a long and complex procedure and restricted to very pure substances. On the other hand direct methods involve the determination of the principal component without considering the impurities. In this context, quantitative proton NMR has become the "gold standard" for the traceable purity assessment of organic compounds.⁶ In this technique the signal response is directly proportional to the number of nuclei generating the corresponding resonance line. Thus, quantitative results can be achieved using an internal standard of known purity, with uncertainties below 1%. The main drawbacks are the high cost of the instrument and the necessity of experienced operators.⁶ The final objective of these studies is to provide purity values that are traceable to the International System of Units (SI) without using standards of the quantity measured (primary methods).⁵

The concept of online isotope dilution mass spectrometry (IDMS) after a chromatographic separation was developed by Heumann for trace element speciation.⁷ In this context, the

Received: November 8, 2012

Accepted: December 20, 2012

Published: December 20, 2012

continuous postcolumn addition of an enriched isotope of an element, after the complete separation of the naturally occurring species in the sample, allows quantification of compounds for which standards are not available. This postcolumn or online IDMS mode has been mostly applied using the inductively coupled plasma (ICP) ion source, where the ionization efficiency of the element is independent of the chemical form in which the selected element is presented to the ion source. Unfortunately, the use of ICP as ion source restricts enormously its field of application as the extremely low ionization yield of carbon in the plasma and the high carbon background under normal ICP operating conditions seriously hamper its use for the detection of organic molecules. Recently, we introduced the concept of online carbon isotope dilution in combination with GC–combustion–electron ionization–MS as a generic quantitative approach for the determination of volatile organic compounds without the need for specific calibration standards.^{8,9} The combustion reaction warranted quantitative conversion of every organic compound eluting from the GC column into CO₂, providing the required isotopic equilibrium between the CO₂ from such compounds and that from the isotopically enriched carbon tracer (¹³CO₂) continuously added, prior to their combined introduction to the MS. However, this instrumentation could only be applied to volatile organic species which could be separated by GC. Additional developments for the determination of the huge number of existing nonvolatile organic species, particularly for pharmaceutical and biological compounds, are still pending.

Herein we present the combination of the persulfate oxidation reaction in the aqueous phase and online carbon IDMS for the determination of nonvolatile organic compounds after a liquid chromatography separation. The persulfate oxidation reaction in acidic media and at high temperatures (ca. 99 °C) is typically employed in compound-specific isotope analysis by isotope ratio mass spectrometry (IRMS).¹⁰ Surprisingly, we have observed that, contrary to already established and widely accepted beliefs,^{11,12} very specific conditions are required by different organic functional groups in order to get quantitative chemical oxidation to CO₂ with the existing commercial instruments. Our findings can also affect other analytical scientific fields such as IRMS and total organic carbon analysis (TOC) which employ the same oxidation reaction. Under optimum conditions quantitative oxidation is demonstrated for very different nonvolatile organic compounds such as sugars, amino acids, metabolites, and pesticides, paving the way for universal and quantitative online carbon IDMS in the aqueous phase. The capabilities of this approach as a generic quantitative detection system in LC has been assessed with the analysis of a standard mixture of amino acids.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Reagents and Materials. Solid enriched NaHCO₃ (99% ¹³C enrichment) was obtained as a high-purity chemical reagent (purity >98%) from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, U.S.A.). High-purity (≥99%) sodium persulfate and solid phosphoric acid were purchased from Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, U.S.A.). Sea water certified reference material (CRM), certified in dissolved inorganic carbon, was supplied by Andrew G. Dickson (Marine Physical Laboratory, Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego, CA, U.S.A.). Sucrose and *p*-benzoquinone standards (both 99.9% purity), guanidine hydrochloride (>99% purity), and potassium hydrogen phthalate used as internal standard

(99.98% purity) were obtained from Sigma-Aldrich. Individual amino acids, citric acid, and creatine pure standards (with certified purity ranging from 98% to 99.9%) were all purchased from Fluka (Seelze, Germany). ¹³C₁-Labeled creatine was obtained from Cambridge Isotope Laboratories. Hexazinone pure standard (99.9% certified purity) was supplied by Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Ultrapure water (18.2 MΩ·cm) was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA).

Instrumentation. *FIA System for the Measurement of Dissolved Inorganic Carbon (DIC).* The flow injection analysis (FIA) system designed for this purpose consisted of an LC pump for pumping the mobile phase (ultrapure water at a flow of 300 μL/min) and a Rheodyne (Rohnert Park, CA, U.S.A.) LC six-way valve for injecting the standards and samples. An additional peristaltic pump was employed to dose a constant flow of 50 μL/min (calibrated by weight) for both the phosphoric acid (0.1 M) and the ¹³C-enriched spike (100 ppm as sodium bicarbonate). A Fissons (Thermo Scientific, Bremen, Germany) MD 800 quadrupole mass spectrometer with electron ionization source was used as detection system. To separate the CO₂ from the aqueous flow and transfer it to the mass spectrometer, a carbonate removal device CRD300 (Dionex, CA, U.S.A.) followed by an MD-050 Nafion gas dryer (Permapure, NJ, U.S.A.) was placed prior the mass spectrometer. The CO₂ present in the liquid phase is purged by a helium counter current in the CRD300 and is subsequently dried in the Nafion dryer under a counter current of nitrogen prior its introduction to the mass spectrometer via an open split. PEEK tubing (0.02 in. i.d.) and PEEK “T” connectors were employed to connect the different components of the FIA system.

LC–Chemical Oxidation–IRMS System. For the evaluation of the wet-chemical oxidation method, a Thermo Scientific (Bremen, Germany) LC–IRMS instrument consisting of an Accela 600 pump, an LC–Isolink interface, and a Delta V Advantage mass spectrometer was used. The LC pump was set at 300 μL/min using Milli-Q water as mobile phase. The oxidation interface was programmed as recommended by the manufacturer: reagent pumps were set at 50 μL/min each with concentrations of 0.3 and 1.5 M for the sodium persulfate and the phosphoric acid, respectively, and the reactor was set at a temperature of 99.9 °C. The spike was introduced prior the interface by means of a P-500 high-precision pump (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, U.K.) and a PEEK T-piece.

Procedures. *Calibration of the NaH¹³CO₃ Flow Rate.* An accurate flow rate for the spike was achieved via a high-precision pump (2 mL/h). To know the exact amount of the spike mixed with the mobile phase that carries the analytes, a series of five injections of a solution of known concentration of a primary standard [potassium hydrogen phthalate (KHP) at ca. 50 ppm], or sodium bicarbonate for the DIC measurements, were injected prior to the samples, with typical relative standard deviation (RSD) values around 1%. Sodium bicarbonate was preferably employed instead of sodium carbonate as alkaline Na₂CO₃ solutions tend to exchange CO₂ from ambient air. For the quantification of the amino acid mixture, a known amount of KHP was added to the mixture prior the LC separation.

Quantification Using Postcolumn IDMS. The isotope ratio ¹²C/¹³C is measured as the signal ratio at masses 44/45 corresponding to the natural abundance ¹²CO₂ from the sample and the enriched ¹³CO₂, added online, respectively. Thus, the signal intensities at these *m/z* ratios are monitored and the isotope ratio between them is calculated to build the isotope

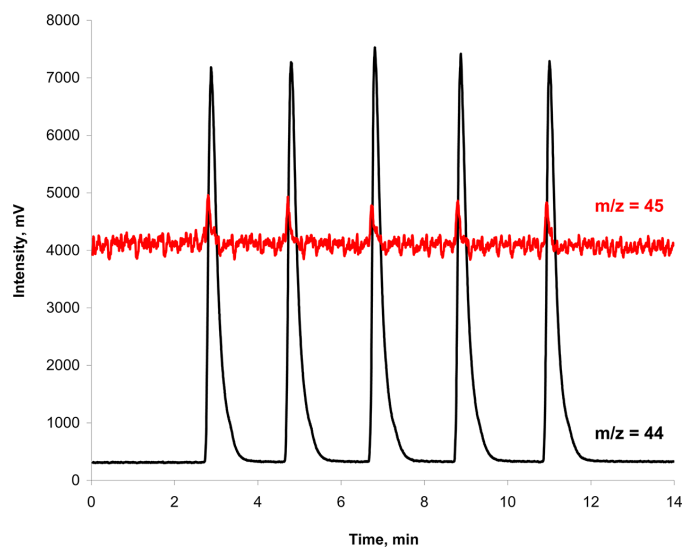


Figure 1. Online isotope dilution FIAGram for the DIC certified reference material.

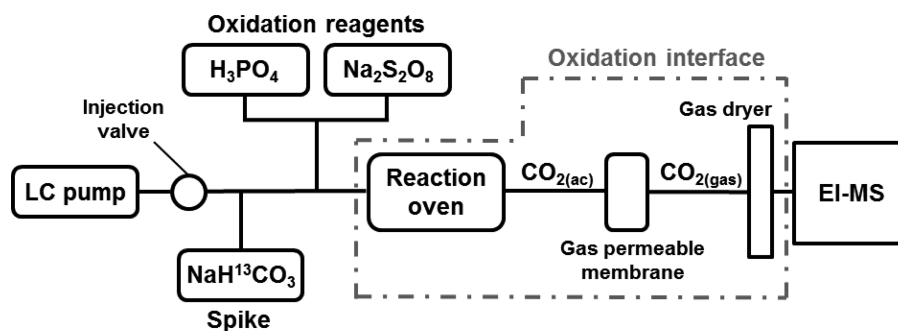


Figure 2. Schematic diagram of the instrumental setup used for the evaluation of the sodium persulfate reaction by carbon online isotope dilution.

ratio chromatogram. This isotope ratio is introduced into the postcolumn isotope dilution equation^{8,9} obtaining a mass flow chromatogram whose integration provides directly the amount of carbon eluted in each chromatographic peak.

LC Method for Amino Acid Separation. For the separation of the amino acid standard mixture, a Sielc primesep A mixed mode LC column (15 cm × 2.1 cm × 5 μm, Sielc Technologies, Prospect Heights, IL, U.S.A.) was used with a sulfuric acid gradient. The chromatographic method was adapted from the originally developed by McCullagh et al.¹³ In our case mobile phase A (100% water) was pumped for 2 min, and then a linear gradient was established raising up to 100% B (0.2% v/v H₂SO₄) in 10 min; 100% B was kept until the end of the analysis. The total run time was 22 min. The flow rate was 300 μL/min, and the column temperature was set at 40 °C. A 10 μL sample loop was used.

RESULTS AND DISCUSSION

Initial Evaluation of the Procedure with Inorganic Standards. The first step carried out was the evaluation of the quantitative measurement procedure using inorganic carbonate standards. For this purpose, a simple flow injection system was

designed in which standard solutions of natural abundance sodium bicarbonate were injected in a pure water carrier flow and mixed with a continuous flow of ¹³C-labeled sodium bicarbonate. After mixing, a constant flow of phosphoric acid was added to form carbon dioxide which was separated from the aqueous phase using a gas-permeable membrane as indicated in the Experimental Section. The gaseous carbon dioxide was taken to an old MD-800 quadrupole mass spectrometer for the measurements at masses 44 and 45 after electron ionization. An example FIAGram obtained for a quintuplicate injection of a seawater sample is shown in Figure 1 for masses 44 (transient signal) and 45 (constant signal). The intensity chromatogram shown in Figure 1 was transformed to a mass flow chromatogram using the online IDMS equation,^{8,9} and the peaks were integrated. Validation of the procedure was performed by measuring a certified reference material consisting of a seawater certified in DIC.¹⁴ The result obtained (24.19 ± 0.19 ppm C, n = 5) was in good agreement with the certified value (24.16 ppm C), with a precision below 1% RSD.

Optimization and Validation of the Carbon Online Isotope Dilution System. The next step was the evaluation of the whole procedure including the chemical oxidation of

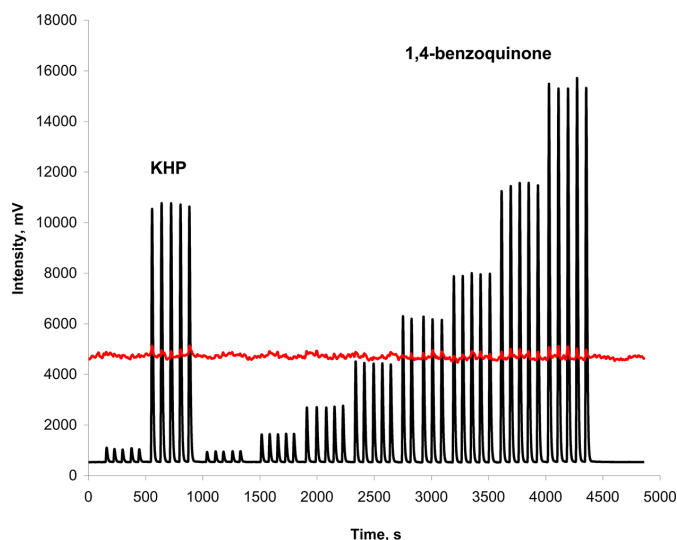


Figure 3. Example of an online isotope dilution FIAGram for increasing concentrations of 1,4-benzoquinone.

organic compounds. In this case, we employed a commercially available LC–oxidation–IRMS instrument modified to perform online IDMS. The procedure was optimized initially in the flow injection configuration (i.e., without a chromatographic column). The flow injection system used for this purpose can be seen in Figure 2. It consisted of an LC–Isolink interface with an auxiliary pump for supplying the spike via a “T” connection. After injection, constant flows of oxidation reagent (sodium persulfate), phosphoric acid, and the ^{13}C -enriched spike (sodium bicarbonate) were continuously added. The mixture flow was then introduced into the heated reactor, already set at a temperature of $99.9\text{ }^{\circ}\text{C}$, where the carbon atoms present in the organic compounds were oxidized to CO_2 . After cooling, the carbon dioxide formed was subsequently extracted into a He gas stream by means of a gas-permeable membrane. Such He flow, containing a mixture of natural abundance and isotopically enriched CO_2 , was first dried through two Nafion membranes and then taken into the electron ionization source for carbon isotope ratio measurement. The isotope ratio at masses 44/45 ($^{12}\text{CO}_2^+$ to $^{13}\text{CO}_2^+$) was measured as a function of time in order to build a mass flow FIAGram using the online isotope dilution equation.^{8,9} Thus, the integration of the obtained FIAGram provided directly the amount of carbon that eluted in each peak. For traceability purposes the calibration of the ^{13}C postcolumn mass flow was performed by injecting either a natural abundance sodium carbonate primary standard or KHP primary standard. It is worth stressing that either of those standards can be used for the generic quantification of any organic compound.

A range of aqueous-soluble organic standards of known purity was first evaluated using the operating conditions recommended by the manufacturer and detailed in the Experimental Section. The completeness of the oxidation reaction and the linearity were evaluated using both an easy (sucrose) and a hard (benzoquinone) to oxidize compound. These two compounds were selected as they are employed in the U.S. EPA method 643 (TOC analysis) to prepare the “system suitability” test solutions intended to evaluate the

correct performance of a particular TOC analyzer. A typical FIAGram obtained by this isotope dilution method is shown in Figure 3 for increasing concentrations of benzoquinone. The first five peaks at mass 44 correspond to the reagent blank, then five peaks for the potassium hydrogen phthalate standard, five blanks again, and then increasing concentrations of benzoquinone. The calibration resulted linear ($R^2 = 1$) in the whole concentration range assayed, up to 85 ng of C injected. Similar results were obtained for sucrose. The detection limit obtained from three times the standard deviation of the intercept of the calibration line was 1 ng C ($10\text{ }\mu\text{L}$ injection). The overall recoveries, obtained from the slopes of the calibration lines for both sucrose and benzoquinone, were quantitative and are shown in Table 1. Table 1 also shows that quantitative or nearly

Table 1. Quantification of Different Compounds by Carbon Online Isotope Dilution Using the Standard Operating Conditions

compd	found [$\mu\text{gC/g}$]	recovery [%]
1,4-benzoquinone	49.7 ± 0.8	100 ± 2
sucrose	43.1 ± 0.6	100 ± 1
citric acid	18.9 ± 0.5	100 ± 3
cysteine	14.2 ± 0.1	99 ± 1
methionine	45.1 ± 0.4	100 ± 1
lysine	24.5 ± 0.3	96 ± 1
proline	26.2 ± 0.5	100 ± 2

quantitative recoveries were obtained also for other pure organic compounds including citric acid and the amino acids methionine, cysteine, lysine, and proline injected at different concentration levels. However, nonquantitative recoveries were obtained for other organic compounds such as arginine ($83\% \pm 3\%$), guanidine ($36\% \pm 2\%$), creatine ($78\% \pm 3\%$), hexazinone ($76\% \pm 1\%$), adenine ($41\% \pm 1\%$), guanine ($52\% \pm 7\%$), and uracil ($53\% \pm 1\%$). In those cases the nonquantitative recovery was ascribed to an incomplete oxidation of the molecule to CO_2 . This incomplete oxidation could only be detected using

Table 2. Guanidine and Creatine Recoveries under Different Oxidation Conditions

conditions	carrier flow [$\mu\text{L min}^{-1}$]	acid flow [$\mu\text{L min}^{-1}$]	oxidant flow [$\mu\text{L min}^{-1}$]	guanidine recovery [%]	creatine recovery [%]
1	300	50	50	36 \pm 2	78 \pm 3
2	240	40	40	42 \pm 3	81 \pm 1
3	180	30	30	53 \pm 2	84 \pm 1
4	120	20	20	65 \pm 2	84 \pm 2
5	60	10	10	78 \pm 3	89 \pm 1
6	60	20	20	82 \pm 6	91 \pm 3
7	60	30	30	88 \pm 7	93 \pm 1
8	40	7	7	88 \pm 2	90 \pm 2
9	40	10 ^a	10	99 \pm 4	94 \pm 1
10	40	20 ^a	20	99 \pm 3	96 \pm 2
11	40	10 ^b	10		101 \pm 1
12	40	20 ^b	20		98 \pm 1

^a200 ppm Ag. ^b400 ppm Ag.

the proposed approach as the calibration graphs obtained were still completely linear ($R^2 > 0.999$) and reproducible. However, the reasoning of using the linearity of the C signal to demonstrate the completeness of the oxidation process is well-established in IRMS.^{10,11} Results obtained here clearly demonstrate that this approach can be wrong. Linearity of the signal versus the amount of carbon injected does not demonstrate quantitative oxidation. Interestingly, all the compounds which were not completely oxidized presented one or several carbon atoms bounded to two or three nitrogen atoms or formed aromatic N-heterocycles. Particularly, the carbon that belongs to the guanidinium group was suspected to be the most difficult to oxidize in this particular case. Interestingly, creatine (four C atoms) and hexazinone (12 C atoms) contain one and three guanidinium-type C atoms, respectively, which is consistent with the recoveries obtained close to the 75% theoretical (if three out of each four carbon atoms are oxidized). In addition, very poor recoveries were obtained for the nitrogenous bases adenine, guanine, and uracil, which supports the idea of poor oxidation of the carbon–nitrogen bond. On the other hand, the recovery for urea was quantitative ($99.7\% \pm 0.7\%$, $n = 3$) which supports the idea that a double C–N bond or an aromatic N-heterocycle is required to prevent the oxidation of the carbon to CO_2 . Surprisingly, the increase of the concentration of the oxidant from 0.3 to 0.75 M and the addition of transition metals as catalyzers to the acid flow [Ag(I), Fe(II), Fe(III), and Cu(II) at 200 ppm level] did not result in any recovery improvement for creatine. On the contrary, much higher background, signal noise, and RSD between injections were observed.

In order to unveil this issue a ^{13}C -labeled creatine standard, labeled exclusively at the guanidinium carbon (^{13}C enrichment = 99%), was employed. In this case, the ^{13}C -enriched sodium bicarbonate was not added for the direct measurement of the 44/45 isotope ratio of the compound under different operation conditions. Under the standard operating conditions, the value obtained for the isotope ratio 44/45 was very high (12.0 ± 0.2 , $n = 5$), differing largely from the theoretical isotope ratio expected if quantitative oxidation of that labeled carbon was achieved (ca. a ratio of 3). In fact, this isotope ratio value obtained implied that only 22% of the guanidinium carbon was oxidized to CO_2 , which matches fairly well with the experimental recovery obtained before for the natural abundance creatine ($78\% \pm 3\%$). Interestingly, poor yields were also obtained 30 years ago from guanidine-like compounds when searching for oxidizing methods for the

determination of total dissolved nitrogen in waters.¹⁵ Hence, further studies were focused on the optimization of the chemical oxidation conditions.

First, the influence of the reaction time (kinetics) in the oxidation yield (recovery) was studied by decreasing the overall flow rates. For these experiments, natural abundance creatine and guanidine were employed. The results obtained are shown in Table 2 after decreasing the global flow from 400 to 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ (conditions 1–5), while maintaining the ratio of flow rates between the carrier and reagents constant. In this way, the residence time in the reactor at 99.9 °C was increased 5 times (approximately from 30 to 150 s). As can be observed in Table 2, the recoveries increased to $78\% \pm 3\%$ and $89\% \pm 1\%$ for guanidine and creatine, respectively.

A second experiment was performed using ^{13}C -enriched creatine labeled in the guanidinium carbon. The isotope ratios (44/45) observed for the labeled creatine under the different conditions are shown in Figure 4. In this case the isotope ratio diminished clearly with the reduction of the flow rate,

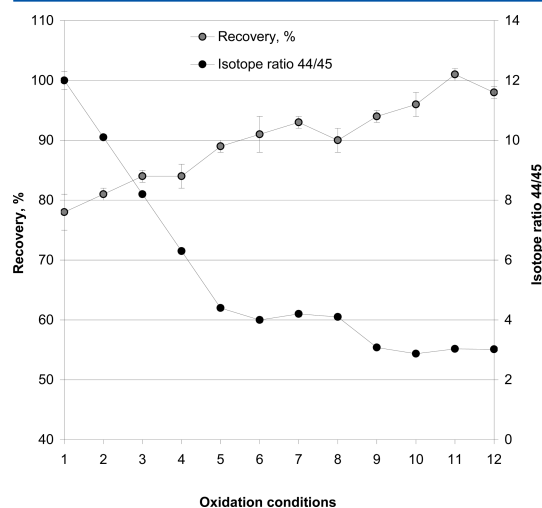


Figure 4. Evolution of the $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ (measured as 44/45) isotope ratio for ^{13}C -labeled creatine and the recovery obtained for natural abundance creatine under the different oxidation conditions given in Table 2.

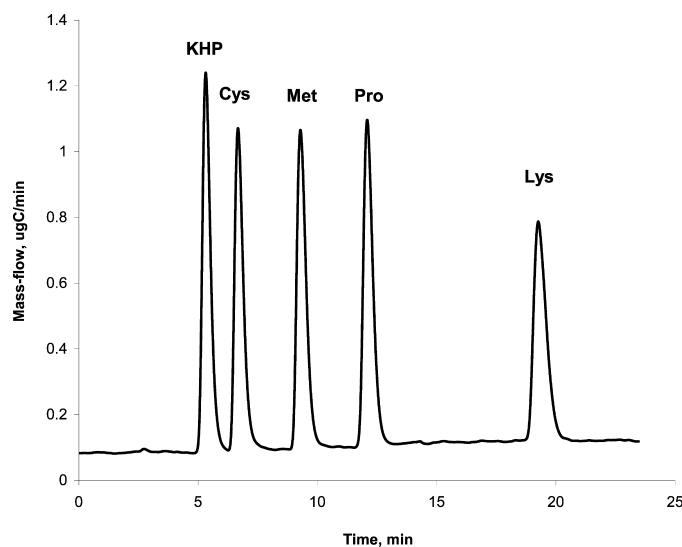


Figure 5. Mass flow chromatogram of a mixture of amino acids plus KHP as internal standard for quantification.

indicating an increase in the percentage of the guanidinium carbon that was being oxidized. Increasing the flow rate of the oxidation reagents or decreasing the flow rate down to 40 $\mu\text{L}/\text{min}$ (conditions 6–8 in Table 2 and Figure 4) led only to a slight increase in the recoveries for guanidine and creatine and relatively lower values for the isotope ratio 44/45 (4.1 ± 0.1). This last value corresponded with a 70% of oxidation of the guanidinium carbon, which translated into a theoretical recovery for creatine of 92%, which is again in very good agreement with the experimental recovery for natural abundance creatine found under these conditions ($90\% \pm 2\%$, see Table 2). Similarly, the oxidation yield obtained for guanidine notably increased at lower flow rates, from $36\% \pm 2\%$ to $88\% \pm 2\%$ (condition 8 in Table 2). Although these oxidation rates were already much higher than those obtained under the manufacturer-recommended conditions (condition 1, Table 2), they were still not quantitative, hampering the use of this methodology for the quantification of any organic compound in aqueous phase. Moreover, the oxidation of very difficult compounds, such as adenine, was still very low ($50\% \pm 1\%$ and $52\% \pm 4\%$ for conditions 7 and 8, respectively). In order to increase further the oxidation yield, Ag(I) was again assayed as catalyst at two concentration levels under the new conditions with longer residence time (conditions 9–12 in Table 2 and Figure 4). At the low-concentration level (Table 2, footnote a, 200 ppm Ag), guanidine oxidation was already complete while creatine increased slightly to $96\% \pm 2\%$. The recoveries for other difficult compounds, such as arginine and adenine, increased to $102\% \pm 1\%$ and $93\% \pm 2\%$, respectively. Finally, at the higher concentration level (Table 2, footnote b, 400 ppm Ag, conditions 11 and 12), creatine and adenine recoveries obtained were quantitative, $99\% \pm 1\%$ and $98\% \pm 1\%$, respectively. Complete oxidation of creatine was strongly corroborated by the carbon isotope ratio measured for the labeled compound under these conditions, 3.02 ± 0.02 (Figure 4), which matched the expected value.

Carbon Online Isotope Dilution as a Quantitative Detection System in LC. Finally, the potential of this isotope

dilution approach as a quantification system in liquid chromatography without the need for specific standards was evaluated. The use of 100% aqueous mobile phases is mandatory to eliminate carbon background signal as the chemical oxidation reaction is not selective. It is obvious that this issue narrows down the range of analyzable compounds to, in general, low molecular weight polar compounds that can be separated either by reversed-phase or ion-exchange chromatography. Although this is a considerable limitation there are still a high number of compounds of interest such as metabolites, pesticides, or drugs for which traceable standards do not exist and for which our method could offer a useful alternative. Additionally, the development of new “green” chromatographic columns may expand the range of applications to nonpolar compounds. For this purpose a mixture of the four certified amino acids previously quantified by FIA, cysteine, proline, methionine, and lysine, containing 47 ppm (as carbon) of each compound was prepared. The same amount of KHP was added to the mixture as internal standard for quantification. An example of the chromatogram obtained after the separation using the method previously described is shown in Figure 5. Baseline resolution for all the compounds was obtained within a 20 min run. Table 3 shows the recovery values obtained for $n = 3$ independent measurements. As can be seen recoveries ranged from $96\% \pm 2\%$ to $102\% \pm 2\%$ demonstrating the potential of this postcolumn isotope dilution strategy for the quantification of water-soluble organic compounds separated by LC using a single generic organic standard, providing that quantitative oxidation to CO_2 is achieved. This application could be

Table 3. Quantification of an Amino Acid Mixture by LC–Oxidation–IDMS

compd	found [$\mu\text{gC}/\text{g}$]	recovery [%]
cysteine	47 ± 1	99 ± 2
methionine	49 ± 1	102 ± 2
proline	46.8 ± 0.4	98 ± 1
lysine	45 ± 1	96 ± 2

extremely useful for the direct purity assessment of new synthetic compounds (i.e., pharmaceutical or peptides) where certified standards are not available.

CONCLUSIONS

In summary, we present a novel setup for the quantification of organic compounds in liquid phase without the need for specific standards. The method is based on the concept of online carbon isotope dilution mass spectrometry.⁷ The potential analytical applicability of the approach described is very wide. The main application field could be the purity assessment of organic calibrators, as required for the establishment of traceable calibration solutions or direct assay standards. Traditionally, organic purity is determined using LC or GC and subsequent correction for the key purity parameters (water content, inorganic residue, and residual solvents) using additional techniques. However, LC and GC are not directly traceable to the SI unless a pure CRM of the analyte is available. The presented method allows the direct determination of the mass fraction of the analytes using a primary standard such as KHP as a generic quantification standard during an LC separation. The main advantages in comparison to the established approaches for purity assessment are simplicity, applicability to low-purity samples, easy coupling with chromatographic techniques, and affordable instrumentation.

Further instrumental developments are required to increase the kinetics of the oxidation reaction and avoid peak broadening in LC applications. Absolute quantifications and carbon-specific isotope ratio measurements performed have proven unequivocally that compounds containing guanidine-like carbons or aromatic N-heterocycles are hardly oxidized under the standard recommended conditions, although they show excellent linearity between signals obtained and increasing concentrations. Importantly, this finding could be of interest to different scientific fields, such as LC-IRMS or (online) DOC-TOC analysis.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34-985103069 (J.R.E.); +34-985103484 (J.I.G.A.).
Fax: +34-985103125 (J.R.E.); +34-985103125 (J.I.G.A.). E-mail: ruizjorge@uniovi.es (J.R.E.); jiga@uniovi.es (J.I.G.A.).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN; project CTQ2009-12814) and FICYT (PC10-58). S.C.D. acknowledges FICYT for the provision of a Ph.D. Grant. The provision of FEDER funds for the purchase of the IRMS instrument is also acknowledged.

REFERENCES

- (1) Fink, T.; Bruggesser, H.; Reymond, J. L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2005**, *44*, 1504–1508.
- (2) Ertl, P. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**, *43*, 374–380.
- (3) Fiehn, O.; Weckwerth, W. *Mass Spectrometry: Quantitation. In Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*; Ganten, D., Ruckpaul, K., Eds.; Springer: New York/Heidelberg, 2006; Vol. 13, pp 1030–1034.
- (4) Zhang, B.; Li, X.; Yan, B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 299–301.
- (5) Duewer, D. L.; Parris, R. M.; White, E.; May, W. E.; Elbaum, H. *Natl. Inst. Stand. Technol. Spec. Publ.* **1012**; U.S. Department of Commerce, U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2004.
- (6) Malz, F.; Jancke, H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 813–823.
- (7) Heumann, K. G. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1992**, *118/119*, 575–592.
- (8) Díaz, S. C.; Encinar, J. R.; Sanz-Medel, A.; Alonso, J. I. G. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *48*, 2561–2564.
- (9) Díaz, S. C.; Encinar, J. R.; Sanz-Medel, A.; Alonso, J. I. G. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 6862–6869.
- (10) Krumenn, M.; Hilkert, A. W.; Juchelka, D.; Duhr, A.; Schlüter, H. J.; Pesch, R. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2260–2266.
- (11) Godin, J. P.; Fay, L. B.; Hopfgartner, G. *Mass Spectrom. Rev.* **2007**, *26*, 751–774.
- (12) Juchelka, D.; Krumenn, M. Thermo Application Note 30065. https://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Product/productPDF_56679.PDF; accessed January 4, 2013.
- (13) McCullagh, J. S. O.; Juchelka, D.; Hedges, R. E. M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 2761–2768.
- (14) Dickson, A. G. *CDIAC Communications* **1998**, *25*, 16.
- (15) Nydahl, F. *Water Res.* **1978**, *12*, 1123–1130.

D.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO LC-oxidación-MS Y DILUCIÓN ISOTÓPICA EN LÍNEA DE ^{13}C A LA CERTIFICACIÓN DE LA PUREZA DE SUSTANCIAS ORGÁNICAS PURAS

D.3.1 Validación de la metodología para la certificación de la pureza de sustancias orgánicas polares de baja complejidad estructural: participación en el estudio piloto p117c organizado por el BIPM

D.3.1.1 Resumen de resultados del ejercicio de intercomparación p117c

Initial summary of results for CCQM-K55.c/P117c. Circulated to study participants 19/10/2012.

Initial Result Summary for Participants: October 2012

CCQM-K55.c / CCQM-P117.c (L-(+)-Valine)

Project Name: CCQM-K55.c (L-Valine) & Parallel Pilot Study CCQM-P117.c

Comparison: Characterization of Organic Substances for Chemical Purity

Initial Study: 5/2012 to 9/2012

Participants in CCQM-K55.c

Bureau International des Poids et Mesures (BIPM)
Sèvres, France

Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
Geel, Belgium

National Measurement Institute (Australia) (NMIA)
Pymble, NSW, Australia

Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO)
Xerem, Brazil

Measurement Science and Standards, NRC Canada (NRC)
Ottawa, Canada

National Institute of Metrology of China (NIM)
Beijing, China

Laboratoire National de Métrologie et d'Essais (LNE)
Paris, France

Bundesanstalt für Materialforschung (BAM)
Berlin, Germany

Government Laboratory of Hong Kong SAR (GLHK)
Kowloon, Hong Kong

National Metrology Institute of Japan (NMIJ)
Tsukuba, Japan

National Metrology Laboratory (SIRIM)
Sepang, Malaysia

Centro Nacional de Metrologia (CENAM)
Querétaro, Mexico

Mendeleyev Scientific and Research Institute for Metrology (VNIIM)
St Petersburg, Russia

Health Sciences Authority (HSA)
Singapore

National Metrology Institute of South Africa (NMISA)
Pretoria, South Africa

Korea Research Institute of Standards and Science (KRISS)
Daejeon, South Korea

National Institute of Metrology (Thailand) (NIMT)
Bangkok, Thailand

National Metrology Institute of Turkey (UME)
Gebze-Kocaeli, Turkey

LGC Limited (LGC)
Teddington, United Kingdom

National Institute of Standards and Technology (NIST)
Gaithersburg, MD, USA

Participants in CCQM-K55.c

European Directorate for the Quality of Medicine (EDQM)
Strasbourg, France

General State Chemical Laboratory (EXHM)
Athens, Greece

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo (UO)
Oviedo, Spain

Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR)
Samutprakarn, Thailand

British Pharmacopoeia Commission Laboratory (BP)
Teddington, United Kingdom

Introduction

The CCQM-K55 comparison is being undertaken by the CCQM Organic Analysis Working Group (OAWG) for National Measurement Institutes (NMIs) and Designated Institutes (DIs) which provide measurement services in organic analysis under the CIPM MRA.

The ability to undertake suitable purity assessment on materials that are to be provided as pure substance or calibration solution reference materials or are used as the internal primary calibrators of measurement services is considered a core competency for the provision of SI-traceable measurement services in organic analysis. All NMIs with ongoing programs in this area were encouraged to participate in the comparison. It is being undertaken to allow NMIs and DIs to provide objective evidence that the procedure(s) they use for purity assessment, and the property value with its associated uncertainty that is assigned as a result of application of their procedure, are suitable for their intended purpose. The application of the pure material could be for dissemination to external users as pure substance or standard solution Certified Reference Materials or it could be characterized for internal use as the primary calibrator of a reference measurement procedure.

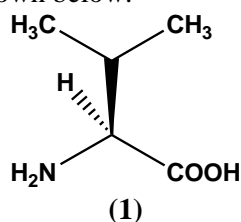
“How Far The Light Shines” Statement for CCQM-K55.c (L-Valine)

The comparison is intended to demonstrate a laboratory’s performance in determining the mass fraction of the main component in a high purity organic material. The measurement results should be indicative of the performance of a laboratory’s measurement capability for the purity assignment of organic compounds of low structural complexity and high polarity (pK_{OW} in range -2 to 2) for which related structure impurities can be quantified directly by high performance liquid chromatography.

Valine was selected as the measurand for the third round of the comparison because it:

- provides an analytical challenge representative of a laboratory’s capability for the purity assignment of compounds of low to moderate structural complexity and high polarity;
- is an amino acid representative of a number of Calibration and Measurement Capability (CMC) claims currently found in or in development for inclusion in either Appendix C of the BIPM Key Comparison Database or the JCTLM Database of Higher Order Reference Materials;
- is an important measurand for the quantification of parent peptides and proteins via hydrolysis to their constituent amino acids. The availability of properly characterized high purity amino acid standards will play a critical role in underpinning the traceability of peptide and protein quantifications that rely on this approach;
- is safe and stable for transport and readily available in an amount to allow the preparation of a relatively large batch of the comparison sample.

The structure of L-(+)-valine (**1**) is shown below.



The structure of related amino acids referred to in this report are given in Annex A.

L-valine is a white crystalline powder with a decomposition point of 296 °C. It has moderate solubility in water but is highly soluble in acidified or basified aqueous solution. It is also moderately soluble in alcohols and polar organic solvents and generally insoluble in non-polar solvents. CMC claims for the measurement of L-valine, disseminated as a component of a standard solution CRM, are listed in the BIPM Key Comparison Database (KCDB) Appendix C. Recently claims for both valine as a pure substance and as a component of a standard have been added to the JCTLM Database of Higher Order Reference Materials.

SOURCE MATERIAL

The comparison material for the CCQM-K55.c comparison and the parallel pilot study CCQM-P117.c was a sample of analytical grade valine purchased from a commercial supplier. The material was supplied as a white crystalline solid and was not subject to further purification. The analysis certificate provided with the material describes its purity as “ $\geq 99.5\%$ (NT)”.

This material was subdivided into a batch of 175 individual units given the BIPM identifier OGP.015. Each unit of BIPM OGP.015 contained 500 mg of the L-valine material in a 5 ml amber glass vial fitted with a rubber insert and crimped with an aluminium cap.

The impurity profile of the batch of sub-divided candidate material vials was determined at the BIPM, including assessment of the homogeneity and stability of the various components. The mass fraction content of valine in the comparison material was assessed by the BIPM to be in excess of 990 mg/g and the homogeneity and stability of the valine and the associated impurity components were determined as being suitable for the purposes of the comparison. A summary of the results for valine content and for characterization of the material's impurity profile reported by the comparison participants are contained in this report.

Participation

Eighteen NMIs or DIs, the IRMM and the BIPM participated in the CCQM-K55.c comparison, making twenty participants in total.

Six additional laboratories requested to participate in the parallel CCQM-P117.c pilot comparison of which five submitted results. Four participants in CCQM-K55.c and one from CCQM-P117.c also submitted estimates for valine based solely on qNMR data, in addition to separate submissions using a mass balance approach. These independent qNMR estimates were all reported under CCQM-P117.c. As a result there are ten results in total reported for CCQM-P117.c. The results obtained by the laboratories participating in CCQM-P117.c are reported anonymously in this summary.

Sample distribution

A minimum of two units of the study sample, each containing a minimum of 500 mg of material, were distributed to each participant. Participants undertaking both an extensive qNMR analysis and a mass balance purity assignment were provided an additional unit on request.

Recipients were asked to confirm on receipt that a monitoring strip inside the shipping container had not registered a temperature in excess of 37 °C during the transport process. These indicated that the units supplied to China (NIM) were exposed to temperatures during transport in excess of 50 °C on two separate occasions. A sample set was shipped to NIM at the third attempt without exposure to excessive temperatures by trans-shipment via the GLHK. The assistance of GLHK in facilitating this delivery to NIM is gratefully acknowledged.

There was an extended delay obtaining Customs clearance for delivery of the samples intended for the CCQM-P117.c study to INTI (Argentina). Otherwise no particular shipping difficulties were encountered.

Quantities and Units

Participants were required to report the mass fraction of valine, the major component of the comparison sample, in one of the units supplied to them.

In addition all participants who used a mass balance (summation of impurities) procedure to assign valine content were required to report the combined mass fraction assignment and associated uncertainty for each of the following sub-classes of impurity:

- i. total related structure organic substances
- ii. water
- iii. residual organic solvent
- iv. total non-volatiles/inorganics

Assessment of the enantiomeric purity of the material was not required, but nevertheless several participants did investigate the amount of D-valine in the sample.

The measurement units for reporting the mass fraction content of valine were mg/g.

Participants were encouraged to also provide where possible mass fraction estimates for the minor impurity components of the comparison sample.

Reported Mass Fraction Content of Valine in CCQM-K55.c

The estimates reported for the content by the comparison participants of CCQM-K55.c and the (unidentified) participants in the parallel pilot study CCQM-P117.c are given in Table 1 and a summary plot is shown in Figure 1. Throughout the report results are plotted with their associated standard uncertainty ($k = 1$). In all figures the data reported by participants in CCQM-K55.c are shown in blue and those of participants in CCQM-P117.c in red.

Methods used to assign purity for the comparison result included mass balance, qNMR, titration and combinations of data obtained using two or more of these approaches.

Impurity Profile of CCQM-K55.c

All participants in CCQM-K55.c using a mass balance procedure were required to give estimates for the mass fraction of the sub-classes of impurities they quantified and combined to obtain their final valine mass fraction estimate.

i. Related structure impurity content

The related structure impurities reported by two or more participants are shown, with their associated numbering, in Annex A. The major compounds identified by participants as present at levels greater than 0.1 mg/g in CCQM-K55.c were, in order of decreasing mass fraction content: alanine (2), leucine (3), isoleucine (4), aminobutyric acid (5), acetic acid and methionine (6). Information on the related structure impurity content was also provided by some participants using a qNMR approach to assign the valine content.

An LC-CAD chromatogram obtained by NIM that is representative of LC chromatograms of underivatised samples of the CCQM-K55.c material when analysed using a reverse phase LC column, showing the relative retention time of each of the main related structure impurities, is shown in Figure 2.

A number of participants also used approaches such as LC-FD or LC-UV after derivatisation (orthophthalaldehyde (OPA) or fluorescein), or GC-MS after derivatisation with silylating reagents. The relative elution profiles and assignment of the components obtained using these approaches were in general very similar in appearance to those shown in Figure 2, though the derivatisation approaches included “noisier” baselines and artefact peaks from the reagents. The majority of participants reported and identified alanine (2), leucine (3) and isoleucine (4) as the major related structure impurities in the comparison material. The presence of an additional impurity was reported by eleven participants, six identifying it as either γ -aminobutyric acid (5) or α -aminobutyric acid while five participants reported it as an unidentified component.

The estimates reported for total related structure impurities by the comparison participants of CCQM-K55.c and CCQM-P117.c are plotted in Figure 3 and listed in Table 2.

A summary of the identity and mass content estimates reported for the individual impurities in the comparison sample is given in Table 3. The individual components are listed in Table 3 in decreasing order of the mean of their reported mass fraction.

Although it was not a requirement for the study, three participants in addition to the coordinating laboratory investigated the enantiomeric purity of the material. Two participants found, as claimed by the coordinating lab, no evidence for the presence of D-Valine in the comparison material. However one participant did report a significant amount (18.5 mg/g). A summary of the different chiral analysis methods and the conclusion of each participant as to the amount of D-valine in the comparison sample is given in Table 4.

ii. Water content

The estimates reported for water content obtained by the study participants are plotted in Figure 4 and are listed in Table 5.

The majority of participants used coulometric Karl Fischer titration to obtain a water content estimate. Although the majority of results indicated the absence of a significant level of water in the material there were several results appreciably in excess of the median value of 0.5 mg/g.

iii. Residual organic solvent/volatile organics content

The presence of trace levels of diethyl ether, 2-methylpropanal and methanol were reported by individual participants but no significant levels of residual solvent were found. One participant reported the presence of acetic acid at the level of 1 mg/g under this category. All other participants who reported acetic acid included it under the related structure impurity category.

The results obtained for residual solvent content are plotted in Figure 5 and listed in Table 6.

iv. Non-volatiles/inorganics content

The estimates reported for combined non volatile organic and inorganics content are plotted in Figure 6 and listed in Table 7. The majority of participants found either very low combined levels of inorganic/non-volatile material in the sample or established that if present it was below the combined LODs of their various methods. Three participants reported levels above 1 mg/g, the highest amount being 2.8 mg with an associated uncertainty of 1.16 mg/g.

qNMR estimates of valine content

The majority of participants in the comparison used a qNMR study in one form or another in their assessment of the material.

qNMR was used:

- as a stand-alone, “direct” method to assign the valine mass fraction content
- to provide an independent estimate of valine content that was combined with other assignment methods (mass balance, titration, etc)
- to obtain supporting data for a mass balance assignment.

Four NMIs which assigned a valine content by mass balance methods as their value for CCQM-K55.c obtained independent estimates by qNMR which they submitted within the CCQM-P117.c. For the direct assignment of valine content by qNMR the signal due to either the alpha or beta hydrogen of valine, or both, were used as the basis for quantification.

The qNMR results for valine reported by each participant are shown in Figure 7. In contrast to the good agreement of the independent qNMR assignments for aldrin obtained in the CCQM-K55.b comparison, the assigned values reported for valine by qNMR ranged from 981 to 996 mg/g, with standard uncertainties generally in the range 1 to 3 mg/g.

A summary of the results, solvent, quantification standards and final use of data by each participant undertaking qNMR is provided in Table 8.

Participant	Valine (mg/g)	Standard uncertainty (mg/g)	Coverage factor	Expanded Uncertainty (mg/g)
CCQM-K55.c				
UME	979.2	1.84	2	3.67
INMETRO	984.9	0.85	1.96	1.7
NMIA	985	2	2.03	4
NRC	987	3.4	2	6.8
NMISA	988.9	3.3	2	6.7
NIST	990.0	0.9	2	1.8
CENAM	990.095	56.38	2	112.76
VNIIM	990.47	0.18	2	0.36
IRMM	990.9	0.6	2	1.3
NIM	990.9	1.14	2	2.28
BAM	991.22	0.16	2	0.31
KRISS	992	0.34	2.78	0.94
HSA	992.1	1.6	2	3.2
NMIJ	992.6	0.51	2	1.1
LGC	992.7	2.3	2.09	4.8
GLHK	992.9	2.50	2	5.0
LNE	992.95	0.85	2	1.7
SIRIM	993.0	1.5	2	3.0
BIPM	993.2	+ 0.18, - 0.70	2	+ 0.36, - 1.40
NIMT	994.25	0.46	2	0.92
CCQM-P117.c				
Lab 1	983.0	1.3	2	2.6
Lab 2	987.7	4.8	2	9.6
Lab 3	990.27	1.81	2	3.62
Lab 4	991.4	4.2	2	8.4
Lab 5	992.0	0.425	3.182	1.4
Lab 6	992.0	2.2	2	4.4
Lab 7	992.5	0.3	2	0.6
Lab 8	992.5	4.3	2	8.6
Lab 9	993.1	2.8	2.78	7.8
Lab 10	1048	47.95	2	95.91

Table 1 : Valine mass fraction estimates for CCQM-K55.c & CCQM-P117.c

CCQM-K55.c & CCQM-P117.c Results Summary October 2012

Page 7 of 18

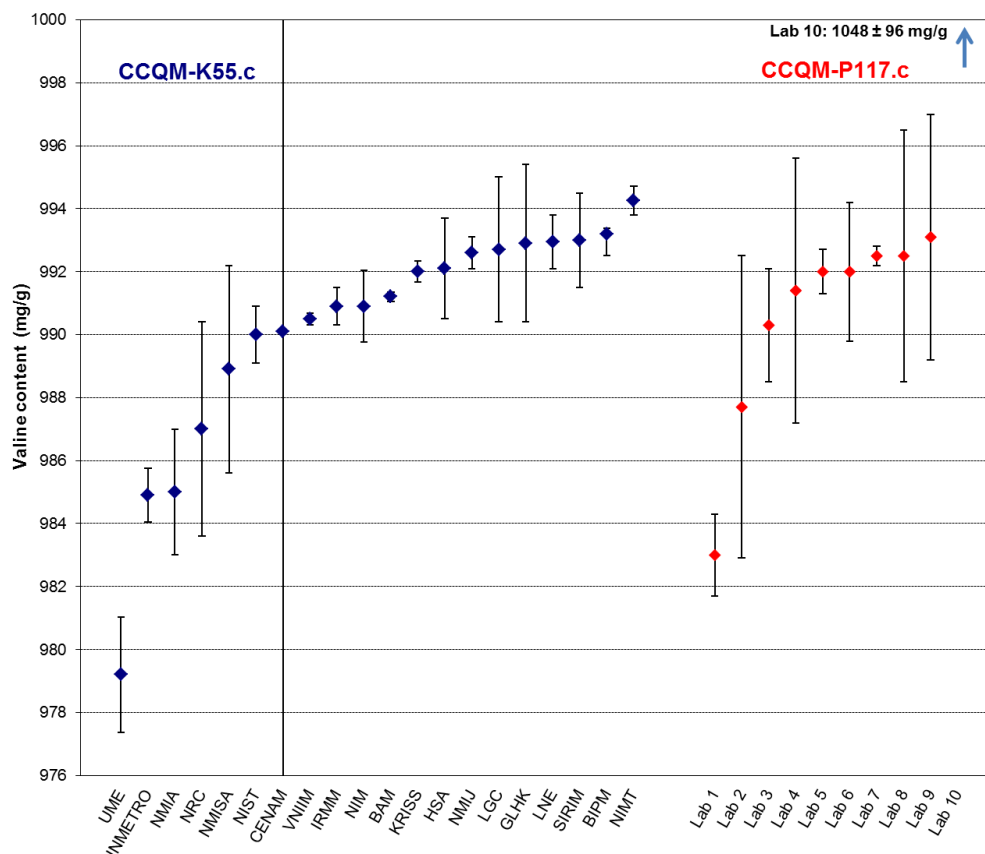


Figure 1 Valine content by participants in **CCQM-K55.c** and **CCQM-P117.c** (with associated standard uncertainties, $k = 1$)

Participant	Related Structure (mg/g)	u_c (mg/g)	Coverage factor	$U_{95\%}$ (mg/g)
CCQM-K55.c				
NIMT	5.46	0.14	2	0.28
IRMM	5.99 *	0.17	2	0.33
LNE	6.58	0.11	2	0.21
BIPM	6.80	+0.61, -0.18	2	+ 1.22 / - 0.36
GLHK	6.97	2.07	2	4.15
LGC	7.12	2	2	4
HSA	7.16	0.09	2	0.18
NMIJ	7.582	0.338	2	0.676
VNIMM	7.61	0.17	2	0.34
NMISA	7.67	0.93	2	1.86
NIM	7.97	0.52	2	1.04
NIST	8.0	0.5	2	1.0
KRISS	8.02	0.057	4.3	0.25
BAM	9.13	0.14	2	0.28
CENAM	9.68	0.47	2	0.94
INMETRO	13.81	0.45	1.97	0.89
UME	20.31	0.133	2	0.265
CCQM-P117.c				
Lab 7	6.3	0.22	2	0.44
Lab 5	7.00	0.3	3.18	1
Lab 4	8.40	4.2	2	8.4

Table 2 – Estimates of total related structure impurities for CCQM-K55.c/CCQM-P117.c

* IRMM value does not include acetic acid (1 mg/g), reported by IRMM under the residual solvent category. Other participants reported acetic acid as a component of their combined related structure impurity estimate

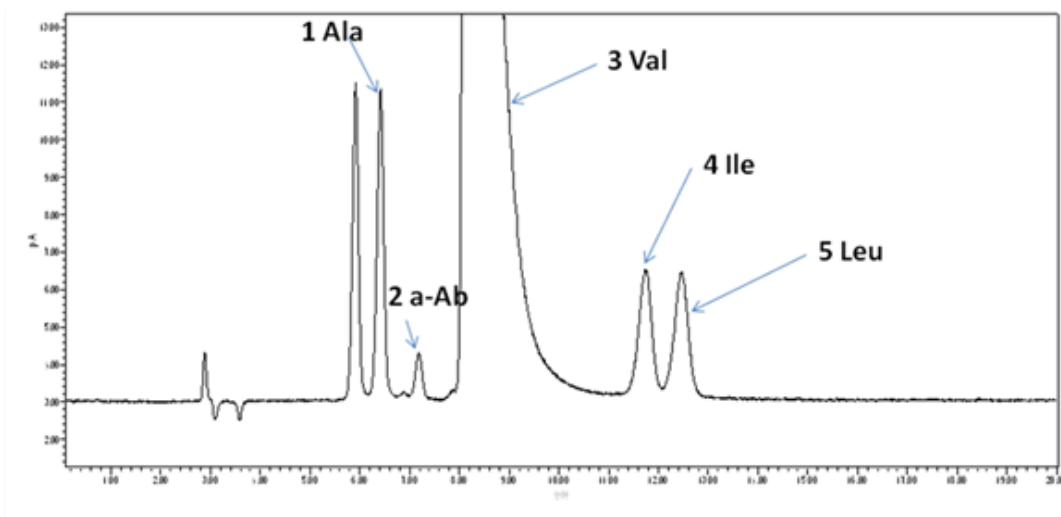


Figure 2 LC-CAD chromatogram for underivatized CCQM-K55.c comparison sample (reproduced with permission from NIM report for CCQM-K55.c)

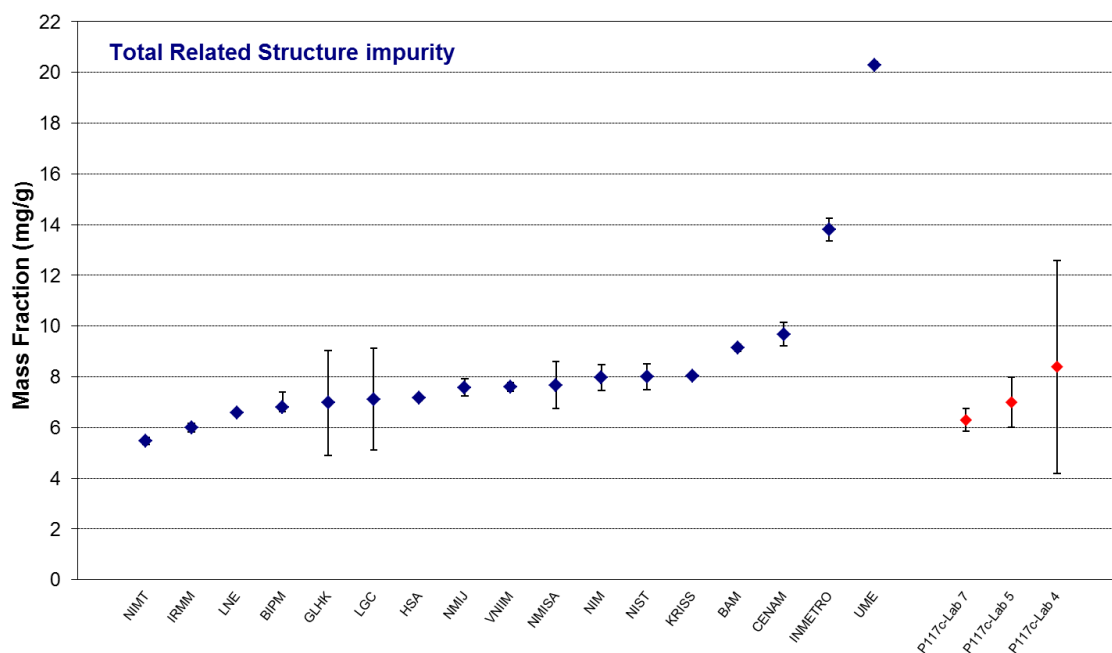


Figure 3 Total related structure impurity estimates by participants in CCQM-K55.c and CCQM-P117.c (with associated standard uncertainties, $k = 1$)

Compound	K55c participants reporting	K55.c Participants quantifying	Mean (mg/g)	Std. dev (mg/g)
Alanine	18	17	2.54	0.34
Leucine	18	17	2.06	0.67
Isoleucine	18	17	1.79	0.32
Acetic acid	6	3	0.65	0.33
Aminobutyric acid	11 ^a	6	0.35	0.06
Methionine	4	4	0.05	0.03

Table 3 – Estimates of individual related substance impurities in CCQM-K55.c
(a) Includes unidentified peaks reported at the corresponding retention time.

Participant	Enantiomeric assay method	D-Valine (mg/g)
BIPM	Conversion to <i>N</i> -alkoxycarbonyl ester derivative followed by GC-FID on Chirasil column	< LOD
INMETRO	Reaction with L-FDAA (Marfey's reagent) followed by LC-MS	18.6
NIM	LC-MS using Astec Chirobiotic column	< LOD
NIST	NMR in presence of chiral resolving agent	< LOD

Table 4 – Estimates of D-Valine content in CCQM-K55.c

Participant	Water (mg/g)	u_c (mg/g)	Coverage factor	$U_{95\%}$ (mg/g)
CCQM-K55.c				
BIPM	0	+0.14 / -0.00	2	+0.28 / - 0
KRISS	0	0.28	4.3	1.2
BAM	0.06	0.02	2	0.03
NMIJ	0.062	0.020	2	0.040
LGC	0.15	0.06	4.303	0.27
GLHK	0.12	0.03	2	0.05
LNE	0.069	0.019	2	0.038
NIST	0.16	0.04	2	0.08
INMETRO	< 0.2	+0/- 0.058	2	+0 / - 0.11
CENAM	0.222	0.0016	2	0.0032
NIM	0.27	0.025	2	0.05
NIMT	0.28	0.20	2	0.40
UME	0.35	0.0192	2	0.049
NMISA	0.64	0.11	2	0.21
HSA	0.72	0.09	2	0.18
VNIIM	1.84	0.04	2	0.08
IRMM	2.47	0.37	2	0.74
NRC	7.65	0.57	2	1.14
CCQM-P117.c				
Lab 4	< 0.6	-	-	-
Lab 5	1	0.3	3.18	1.0
Lab 7	1.2	0.23	2	0.46

Table 5 – Estimates of water content for CCQM-K55.c/CCQM-P117.c

Participant	Residual Solvent (mg/g)	u_c (mg/g)	Coverage factor	$U_{95\%}$ (mg/g)
CCQM-K55c				
BIPM	0	+0.1 / -0.00	2	+0.02 / - 0
KRISS	0	0.02	1.96	0.04
LGC	0	1.1	2	2.2
GLHK	0	1	2	2
LNE	0	0.82	2	1.6
NMISA	0	0.75	2	1.50
NMIJ	0.0017	0.0007	2	0.002
NIMT	0.01	0.30	2	0.60
NIM	0.021	0.011	2	0.022
VNIIM	< 0.02	-	-	-
BAM	< 0.1	-	-	-
NIST	0.16	0.03	2	0.06
IRMM	1.0 *	0.5	2	1.1
HSA	< 2	-	-	-
CCQM-P117c				
Lab 5	0	0		
Lab 4	0.01	0.001	2	0.002
Lab 7	< 0.1	-	-	-

Table 6 – Estimates of residual solvent content for CCQM-K55.c/CCQM-P117.c

* Acetic acid. All other participants quantifying acetic acid reported it as a component of their related structure impurity value

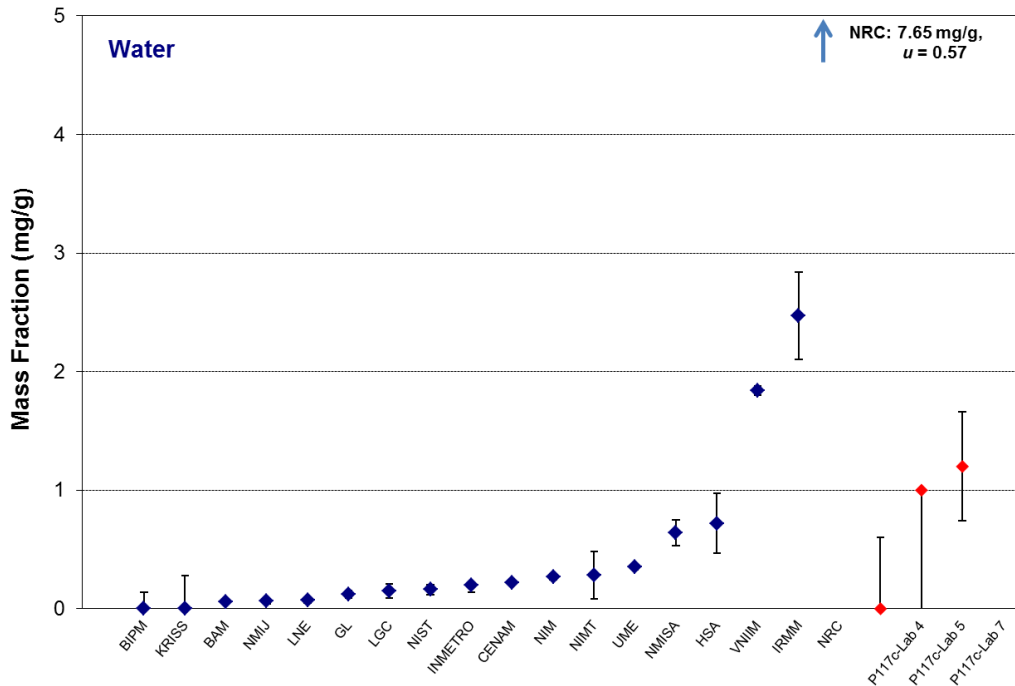


Figure 4 Water estimates by participants in **CCQM-K55.c** and **CCQM-P117.c** (with associated uncertainties, $k = 1$)

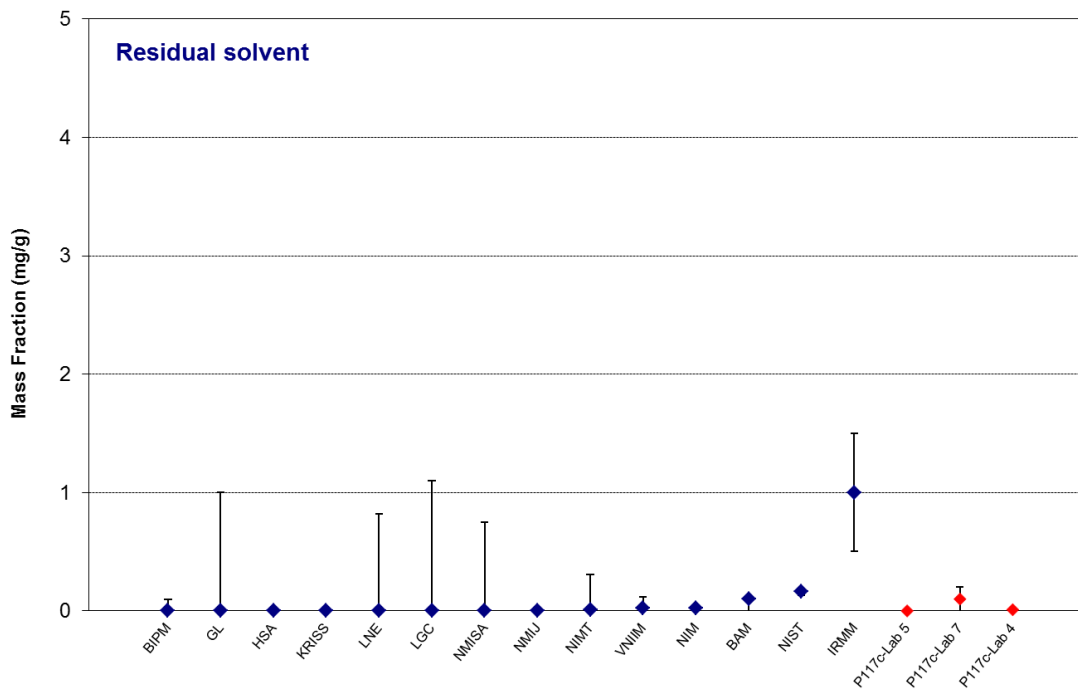


Figure 5 Residual solvent estimates by participants in **CCQM-K55.c** and **CCQM-P117.c** (with associated standard uncertainties, $k = 1$)
(Please see note to Table 6 regarding the IRMM value)

Participant	Non-volatiles (mg/g)	u_c (mg/g)	Coverage factor	$U_{95\%}$ (mg/g)
CCQM-K55c				
BIPM	0	+0.28 / -0.00	2	+0.56 / - 0
GLHK	0	1	2	2
KRISS	0	0.19	1.96	0.37
LGC	0	0.28	2	0.56
NMIJ	0	0.18	2	0.36
CENAM	0.00253	0.00007	2	0.00014
VNIIM	0.083	0.02	2	0.04
IRMM	0.12	0.12	2	0.24
NIM	0.19	0.09	2	0.18
NIST	0.37	0.12	2	0.24
LNE	0.40	0.10	2	0.20
BAM	0.5	0.1	2	0.2
NIMT	< 0.5	-	-	-
INMETRO	1.3	0.72	1.96	1.4
NMIA	< 2	-	-	-
UME	2.05	0.0009	2	0.002
NMISA	2.8	1.16	2	2.32
HSA	< 5	-	-	-
CCQM-P117.c				
Lab 5	< 0.1	-	-	-
Lab 7	< 0.1	-	-	-
Lab 4	0.21	0.11	2	0.22

Table 7 – Estimates of non-volatiles content for CCQM-K55.c/CCQM-P117.c

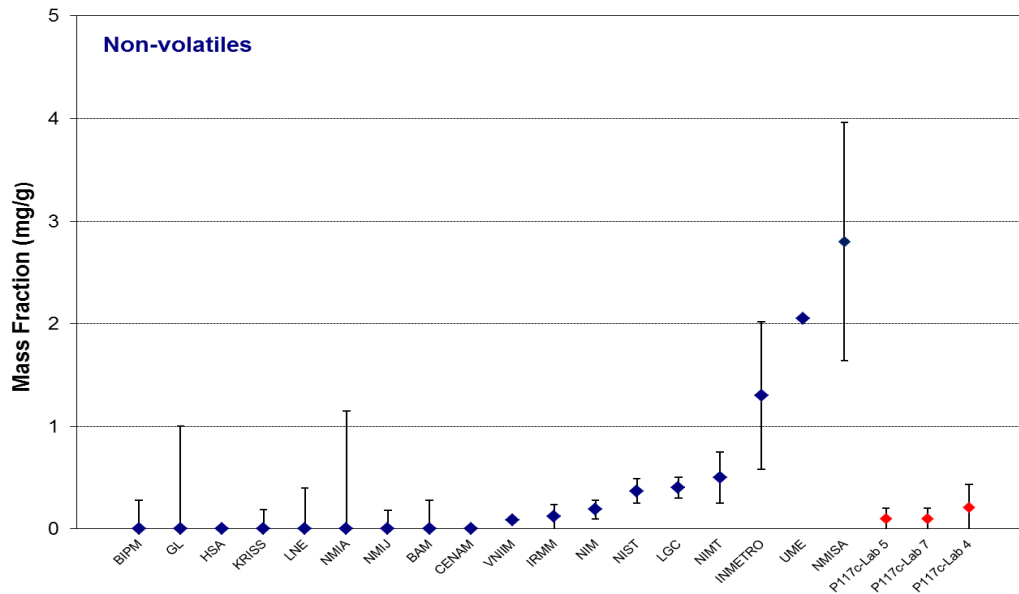


Figure 6 Non-volatile / inorganics estimates by participants in **CCQM-K55.c** and **CCQM-P117.c** (with associated standard uncertainties, $k = 1$)
(NMIA reported < LOD of 2 mg ; HSA reported below LOD of 5 mg)

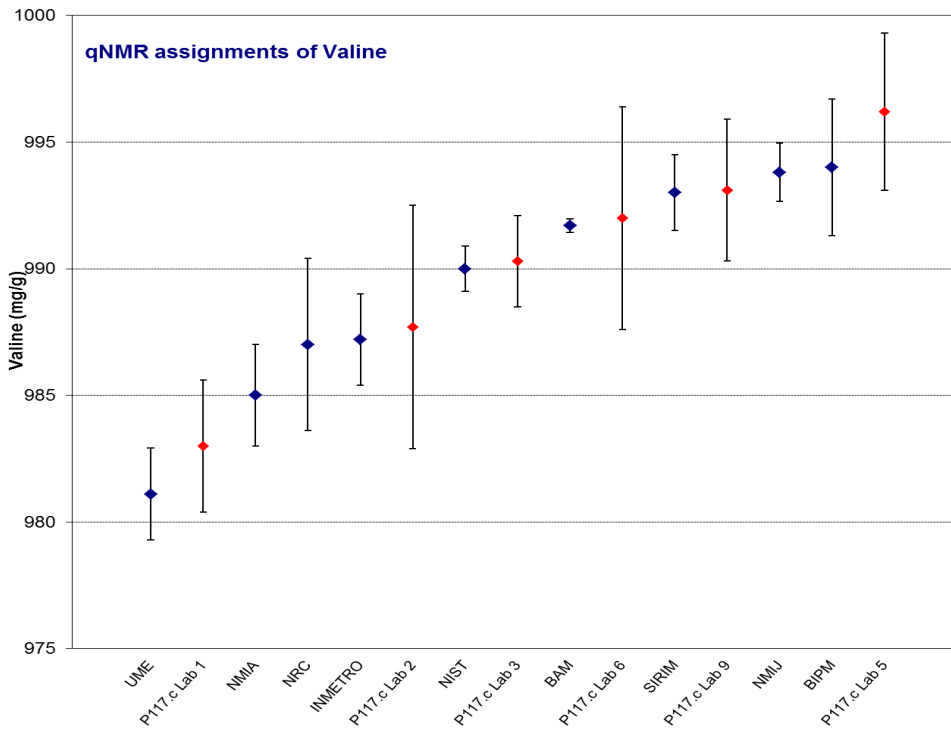
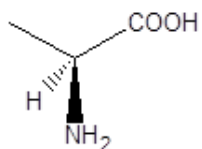


Figure 7 qNMR values for Valine (with associated standard uncertainties, $k = 1$)
(♦ = participant in CCQM-K55.c; ♦ = participant in CCQM-P117.c)

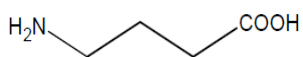
Participant	Solvent(s)	Quantification Standard	Valine (mg/g) by qNMR	Role in Valine assignment
UME	D ₂ O	Benzoic acid	981.05 ($u = 1.15$)	Contributes to K55.c; combined with other data
P117.c Lab 1	D ₂ O	Benzoic acid	983.0 ($u = 1.3$)	Value reported for CCQM-P117.c
NMIA	D ₂ O	Dimethyl sulfone	985 ($u = 2.03$)	Value reported for CCQM-K55.c
NRC	D ₂ O CD ₃ OD	KHP (internal) Benzoic acid (external)	987.0 ($u = 3.4$)	Value reported for CCQM-K55.c
INMETRO	D ₂ O	Maleic acid	987.2 ($u = 3.8$)	Supporting data, information only
P117.c Lab 2	D ₂ O	KHP / maleic acid	987.7 ($u = 4.8$)	Value reported for CCQM-P117.c
NIST	D ₂ O	KHP	990.0 ($u = 0.9$)	Value reported for CCQM-K55.c
P117.c Lab 3	D ₂ O	Creatinine / KHP	990.27 ($u = 1.81$)	Value reported for CCQM-P117.c
IRMM	CD ₃ OD/D ₂ O	Benzoic acid	991.3 ($u = 0.54$)	Contributes to K55.c; combined with other data
BAM	CD ₃ OD/D ₂ O	Benzoic acid	991.72 ($u = 0.27$)	Contributes to K55.c; combined with other data
P117.c Lab 6	D ₂ O	Maleic acid	992.0 (2.2)	Value reported for CCQM-P117.c
SIRIM	CD ₃ OD/D ₂ O	Benzoic acid	993.0 ($u = 1.5$)	Value reported for CCQM-K55.c
P117.c Lab 9	D ₂ O/D+	Benzoic acid	993.1 ($u = 2.8$)	Value reported for CCQM-P117.c
NMIJ	D ₂ O/OD-	KHP	993.78 ($u = 1.82$)	Contributes to K55.c; combined with other data
BIPM	D ₂ O/OD-, D ₂ O/D+	Potassium hydrogen maleate	994 ($u = 2.7$)	Supporting data, information only
P117.c Lab 5	-	-	996.2 ($u = 3.1$)	Supporting data, information only

**Table 8 – qNMR estimates for valine and conditions
(KHP = Potassium hydrogen phthalate)**

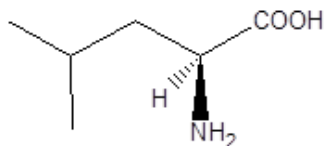
Annex A – Related Structures impurities reported in CCQM-K55.c



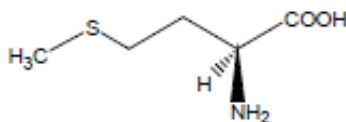
L-Alanine (2)



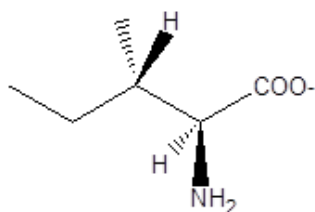
Aminobutyric acid (5)



L-Leucine (3)



L-Methionine (6)



L-Isoleucine (4)

D.3.2 Validación de la metodología para la certificación de la pureza de estándares sintéticos de péptidos

D.3.2.1 Artículo científico V: Anal. Chem. 2013 (Enviado)

“Online carbon isotope dilution for the purity assessment of peptide standards”

***Autores:** Sergio Cueto Díaz, Jorge Ruiz Encinar, José Ignacio García Alonso*

Online Carbon Isotope Dilution Mass Spectrometry for the purity assessment of peptide standards

*Sergio Cueto Díaz, Jorge Ruiz Encinar, * J. Ignacio García Alonso**

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián

Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*Jorge Ruiz Encinar. E-mail ruizjorge@uniovi.es

*J. Ignacio Garcia Alonso. E-mail jjga@uniovi.es

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

KEYWORDS: Isotope dilution mass spectrometry, peptide standards, traceability, quantitative proteomics.

ABSTRACT

We present a novel method for the purity assessment of peptide standards which is applicable to any water soluble peptide and directly traceable to the International System of units (SI). The method is based on the online ^{13}C isotope dilution approach in which the peptide is separated from its related impurities by Liquid Chromatography (LC) and the eluent is mixed post-column with a continuous flow of ^{13}C -enriched sodium bicarbonate. An online oxidation step using sodium persulfate in acidic media at 99°C provides quantitative oxidation to $^{12}\text{CO}_2$ and $^{13}\text{CO}_2$ respectively which is extracted to a gaseous phase with the help of a gas permeable membrane. The measurement of the isotope ratio 44/45 in the mass spectrometer allows the construction of the mass flow chromatogram. As the only species that is finally measured in the mass spectrometer is CO_2 , the peptide content in the standard can be quantified, on the base of its carbon content, using a generic primary standard such as potassium hydrogen phthalate. The approach was validated by the analysis of a reference material (NIST 8327), and applied to the quantification of two commercial peptide standards. In that case, the results obtained were compared with those obtained using alternative methods, such as amino acid analysis and ICP-MS. The results obtained proved the value of the method for the fast, accurate and precise mass purity assignment of synthetic peptide standards.

INTRODUCTION

The field of MS-based quantitative proteomics has growth enormously in the last years.¹³⁰ Protein quantitative analyses, performed in fields such as clinical chemistry or pharmacology, are mainly based on the hydrolysis of the proteins by enzymatic

digestion (e.g. trypsin) and the determination of “proteotypic” peptides by LC-MS/MS. It is clear that, for the development of accurate and reliable methods for protein quantification, there is a real need for SI-traceable peptide standards. Unfortunately, the production of high purity peptide standards, with known degrees of hydration and absence of other impurities such as salts, is not easy and in most cases not possible. As a result, peptide standards need to be certified for purity. Traditionally, peptide purity is established by LC with UV detection but the difference between the LC % purity and the mass % purity for a peptide standard can be as large as 20-30%.¹³¹ Therefore, the simply gravimetric preparation of a synthetic peptide standard solution is not reliable when a good accuracy is sought.¹³² In such cases, the mass fraction of the peptide (peptide content %) is usually carried out through the combination of the peptide concentration determined by amino acid analysis (AAA) and the percent purity obtained by alternative techniques such as CE/LC-UV or MALDI.¹³³ In the search for greater accuracy and precision, the latest AAA procedures involve chemical hydrolysis of the peptides in 6M HCl followed by quantification of the released amino acids by LC or GC in combination with IDMS using labeled analogs. The traceability of this method is achieved through amino acid standard reference materials that are commercially available.¹³⁴ This method has allowed the traceable quantification of various peptide and protein standards with combined expanded uncertainties between 2 and 6%, being the uncertainty associated to the purity of the amino acid standards used the main contribution.¹³²⁻¹³⁷ Although under carefully controlled conditions this procedure provides very good results in terms of accuracy and precision, it is a long, expensive and a labor intensive methodology. The acid hydrolysis is a critical step that requires extensive evaluation in order to avoid or correct for amino acid degradation. Last but

not least, purity assessment carried out by chromatographic (CE, LC) or MS (MALDI) methods, assumes identical instrumental response for the peptide of interest and its related impurities, which brings more uncertainty to the final quantitation. It seems clear that the development of direct and faster methods for peptide purity assessment is required.

In this regard some attempts have been made using elemental ion sources, specifically the inductively-coupled plasma source with mass spectrometry (ICP-MS). This ion source represents an alternative platform for the quantitative analysis of peptides and proteins as its signal is proportional to the amount of the heteroatom measured, independently of its chemical environment, and thus, allowing the use of a single generic standard to calibrate the instrumental response.¹³⁸ The main disadvantage of the technique lies on the necessity of an ICP-detectable element (other than C, N, H, O) in the structure of the molecule to be measured. In the best case, peptides with cysteine or methionine can be directly measured following the S signal.^{139,140} Alternatively, phosphopeptides¹⁴¹ or element-labeled peptides using chemical reactions^{142,143} can also be used. In this line, the determination of bradykinin by europium labeling and post-column IDMS has been recently reported.¹⁴⁴ On the other hand, LC coupled with chemiluminescent nitrogen detection (CLND), has been also evaluated for peptide content determination of crude synthetic peptides.¹⁴⁵ The response of this detection system is directly proportional to the amount of nitrogen and theoretically, can provide quantitative information without the use of individual analytical standards. Nonetheless the use of this detector is not widespread, possibly due to its instrumental complexity and lack of robustness.¹⁴⁶

Recently we described a quantitative detection system for water soluble organic compounds based on post-column isotope dilution, using ^{13}C enriched sodium bicarbonate, followed by online chemical oxidation.¹⁴⁷ Providing that quantitative oxidation is achieved, the only species finally measured is CO_2 , and thus, the mass purity of a compound can be computed just by comparison with a generic standard, as the analytical response for both, the analyte and the internal standard will be proportional to the number of carbon atoms present in each molecule. The approach was validated with different low-MW organic standards (sugars, amino acids, drugs) and its compound independent response was demonstrated. Traceability was ensured by referring the quantitation to a certified primary organic standard (potassium hydrogen phthalate, KHP). Herein we extend the application of this new concept to the purity assessment of peptide standards. Two different approaches are described depending if the peptide can be eluted under 100% aqueous conditions or not. In this latter case a previous purification step by semi-preparative scale LC is proposed. The results are validated using reference materials and by comparison with alternative methods.

EXPERIMENTAL

Reagents and materials. Solid enriched NaHCO_3 (99% ^{13}C enrichment) was obtained as a high purity chemical reagent (purity >98%) from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, Massachusetts, USA). Oxidation reagents, high purity sodium persulfate and solid phosphoric acid, as well as sodium mono and di-hydrogen phosphate (all of them >99%), were purchased from Sigma-Aldrich (St. Gallen, Switzerland). Potassium hydrogen phthalate, KHP (99,98% purity), used as internal standard for quantification,

was obtained from Sigma-Aldrich. Ultrapure water (18.2 MΩcm) was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA).

BAX inhibiting peptide v5 standard (VPMLK) was purchased from Sigma-Aldrich (UV-VIS purity >97%). Cystatin C T4 tryptic peptide standard (ALDFAVGEYNK) was synthesized by PeptideSynthetics (Funtley, UK) (UV-VIS purity >80%), and further purified in our lab by semi-preparative LC. For validation, peptide A from NIST reference material 8327 (DAEPDILELATGYR) with a certified peptide content of $69 \pm 11\%$, was used. All three peptides were obtained as lyophilized powder.

LC-oxidation-IDMS system. A Thermo Scientific (Bremen, Germany) LC-IRMS instrument consisting of an Accella 600 LC pump, a LC-Isolink interface and a Delta V Advantage mass spectrometer was used. A HTC PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) was coupled for sample introduction. The LC-Isolink interface consists basically of two independent pumps for the oxidation reagents, a heated reactor, where the chemical oxidation takes place, and a gas permeable membrane, that separates the CO₂ that results from the complete oxidation of the organic compounds, from the liquid phase. The oxidation reagents pumps in the Isolink interface were set at 50 μL/min each with concentrations of 0,35M and 1,5M for the sodium persulfate and the phosphoric acid respectively, and the reactor was set at a temperature of 99,9°C. The post-column spike flow was introduced prior the interface by means of a P-500 high precision pump (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, U.K.) through a PEEK T piece. All the reagents and mobile phases were degassed under vacuum in an ultrasonic bath, to minimize the background due to dissolved atmospheric CO₂.

Procedures.

Quantification using ^{13}C post-column isotope dilution with internal standard. To quantify the analyte of interest, the isotope ratio $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ is continuously monitored as the signal ratio at m/z 44/45 corresponding to the natural abundance $^{12}\text{CO}_2$ flow that elutes from the column (after chemical oxidation of the corresponding analyte) and the post-column spike flow ($^{13}\text{CO}_2$), respectively. Additionally, a generic standard of known concentration (KHP) is added to the samples (internal) or injected post-column (external). The purpose of using an internal standard is on the one hand, to provide SI traceability to the measurements and additionally, to correct for possible errors occurring during the injection.

LC methods. A Thermo Scientific Biobasix SCX LC column (100 x 1mm, 5 μm) was employed for the analysis of the BAX peptide. Solvents A and B were water and 0,2% H_2SO_4 (v/v) +0,1M Na_2SO_4 , respectively. The peptide was eluted at 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ with a linear gradient from 0% to 100% B in 15 minutes. The temperature was set at 40°C and a 10 μL sample loop was used. For the analysis of the NIST peptide A and the Cystatin C T4 peptide, a Tosoh (Tokyo, Japan) TSKgel 2SW WAX column (250 x 2,1mm, 5 μm) was found to provide the best chromatographic performance. In both cases a phosphate gradient was used for elution. Solvents A and B were phosphate buffers (pH 7) with concentrations of 20mM and 400mM respectively. Column flow was set at 140 $\mu\text{L}/\text{min}$ and the temperature at 25°C. A linear gradient from 0% to 70%B in 30 minutes was used to elute the Cystatin C tryptic peptide. In the case of the NIST peptide an isocratic step was necessary to resolve all the related impurities: 0% to 25% B in 15 minutes (hold for 10 minutes) and rise up to 60% B in 10 minutes.

BAX analysis by FIA-ICPMS. An Agilent 8800 ICPQQQ instrument was used. The quantification was carried out by flow injection analysis and using methionine as generic standard for quantification. The detection of S as SO^+ was carried out as described elsewhere.¹³⁹

Peptide mass-purity assessment by semi-preparative LC and FIA-oxidation-IDMS. This method was used as an alternative approach to the direct analysis of peptides by LC-oxidation-IDMS method and consisted of two steps. First, the peptide standard is purified by RP-LC in a semi-preparative instrument (Agilent, Waldbronn, Germany). A Zorbax Eclipse XDB-C18 column (250 x 9,4mm, 5 μm) was used in this step. Solvents A and B were 0,1% formic acid in water and acetonitrile respectively, and a linear gradient from 0 to 100%B in 35 minutes was established for peptide elution. The detection wavelength was set at 214 nm. The whole pure fraction of the peptide was collected and evaporated to dryness in a vacuum concentrator (Genevac, Ipswich, UK). Next, the fraction was properly diluted in degassed water and injected into the oxidation interface in the Flow Injection configuration (FIA-oxidation-IDMS).

RESULTS AND DISCUSSION

In a previous paper¹⁴⁷ we have studied the optimal conditions for the quantitative oxidation of different organic compounds with persulfate in acidic media and applied the procedure to the purity assessment of amino acid standards. In this paper we expand the concept of on line carbon isotope dilution to the determination of the mass content in synthetic peptide standards. For this study we have selected three different peptide standards of different size and hydrophobicity for which a certified value or alternative analytical data were available. In our procedure, and due to the chemical oxidation step,

the use of 100% carbon-free chromatography is mandatory. So, it could be difficult to find optimal chromatographic conditions that resolve all the possible impurities and analytes, depending on their molecular weight, chemical properties and their recovery from the column. For small-medium size hydrophilic peptides a single determination step is applied in which the LC system is coupled to the oxidation interface, the peptide standard is separated from its impurities by ion exchange, oxidized to CO₂ and quantified by online-IDMS. In the case of larger or less hydrophilic peptides that may require organic modifiers to be eluted from the analytical column, a two-steps alternative approach, is proposed. First, the analyte of interest is purified using a reversed-phase liquid chromatography at semi-preparative scale. The fraction of interest is then collected, evaporated to dryness and re-dissolved in a properly degassed aqueous buffer. Next this solution is injected directly for quantification of the peptide content by Flow Injection Analysis using KHP as calibrant.

Direct LC-oxidation-IDMS analysis. For this initial study we selected a commercial low MW polar peptide (VPMLK) which, due to its small size, is provided as a highly pure standard (UV-VIS purity 99.0%, mass purity 83.0% by amino acid analysis) and was expected to be readily eluted using a 100% aqueous mobile phase. A stock solution was prepared by dissolving 3.04 mg of lyophilized powder of the peptide in 3.3255 g of ultrapure water. So, the stock solution contained 914 µg of solid peptide per gram of solution. This solution was further diluted 1:3 in ultrapure water before injection into the LC-oxidation-IDMS system. All solutions and dilutions were performed on a weight basis. The peptide (pI =10.1) was analyzed by cation exchange chromatography and the internal standard (KHP) was injected post-column, after the elution of the peptide, as the internal standard was not retained in the SCX column.. Five different aliquots were

then prepared and measured in triplicates in different days. The post-column spike flow was set at 33 $\mu\text{L}/\text{min}$ and the concentration of the ^{13}C -enriched bicarbonate was 100 ppm (as C). The mass-flow chromatogram was built and the peptide amount computed from the response factor of the internal standard, KHP. Figure 1 shows one of the chromatograms obtained. Interestingly, a small peak that accounted for ca. 8% of the carbon detected was observed at the column dead time, probably corresponding to the peptide counterion, in this case trifluoroacetic acid (TFA) according to the certificate of analysis provided by the manufacturer. It must be stressed that such counterions usually show a very low sensitivity when using UV-VIS detection, which translates into considerable errors in the purity estimated by simple percent area using this detector. The peptide concentration obtained was $655 \pm 15 \mu\text{g}/\text{g}$ (1 SD, $n=15$ replicates in total) referred to the stock solution which indicates a mass purity of 71.7% which is clearly much lower than the given UV purity (99.0%) and also in disagreement with that given by amino acid analysis (83.0%).

For validation purposes, the concentration of the peptide in the stock solution was determined also by an alternative technique, in this case ICPMS, since the peptide has a methionine residue in its structure and thus, can be detected and quantified from the sulfur content of the molecule. In this case, the peptide amount was determined using a certified methionine solution as calibration standard. Approximately 1ppm (as sulfur) of sample and standard were measured in the ICPMS instrument by flow injection analysis using a 0.5 μL sample loop (see Fig. S1 in the supporting information). Previously, the peptide had been injected in a reverse phase LC-ICPMS system to demonstrate that no other sulfur-containing compounds were present. The concentration obtained for the

peptide stock solution was $638 \pm 20 \mu\text{g/g}$ (1 SD, n=5 replicates), which is in agreement with the value previously obtained by LC-oxidation-IDMS.

Additionally, the direct method was further evaluated by the analysis of the NIST RM8327 reference material. This material consists of three lyophilized peptide standards (peptides A, B and C) with certified peptide mass purity. In this case, peptide A (DAEPDILELATGYR) was selected as it is a perfect example of a tryptic peptide. For the separation we chose the TSK gel 2SW anion exchange stationary phase which provided a very good resolution and peak profile under 100% aqueous conditions. Figure 2 shows a typical chromatogram of peptide A where three related impurities could be satisfactorily resolved from the main peak. In addition, two other significant carbon-containing impurities were also detected at the beginning of the chromatogram, likely corresponding to the counter ion and salts. The KHP co-eluted with the peptide so it was injected post-column after the elution of the peptide. For the mass purity assessment a solution of theoretically $150 \mu\text{g/g}$ of peptide was measured with n=5 replicate injections. The peptide mass content obtained was $61 \pm 2\%$ (1SD), which lies within the confidence interval of the certified value ($69 \pm 11\%$). Interestingly this value is in very good agreement with the experimental data obtained by Pereira et al., using elemental labeling and ICPMS detection, who reported a peptide content of $64 \pm 2\%$ for the same certified material.¹⁴²

Detection limit of the method was found to be $1.4 \mu\text{g/g}$ expressed as carbon (equivalent to $2.7 \mu\text{g/g}$ of peptide A), with an injection volume of $10 \mu\text{L}$. Adequate linearity (more than 2 orders of magnitude) was obtained along the concentration range tested (up to $500 \mu\text{gC/g}$). Sample requirement for a triplicate analysis was as low as $1\text{-}2 \mu\text{g}$ of peptide.

Preparative purification and FIA-Oxidation-IDMS analysis. As mentioned before, an alternative procedure would be the off-line purification of the peptide standard by conventional reverse phase semipreparative chromatography where the peptide of interest is collected, evaporated to dryness and redissolved in an aqueous buffer. Finally the mass purity of the peptide is determined by FIA-oxidation-IDMS. The evaluation of this approach was first performed using the NIST RM8327 peptide A. One vial of the lyophilized material (1.0 mg) was dissolved in 1 mL of pure water and purified by reverse phase chromatography as indicated in the procedures. Figure 3 shows an example chromatogram in which the fraction collected has been highlighted with a blue rectangle. As can be observed there are some small peaks, that correspond to closely related impurities, and that could not be sufficiently resolved from the main peak. Therefore, the UV-VIS purity at 214 nm of the peptide in this peptide-containing fraction was calculated ($96.2 \pm 0.1\%$; $n=3$, 1SD), in order to correct the mass purity. To obtain the peptide content, four independent fractions were collected and analyzed ($n=5$) by FIA-oxidation-IDMS. The peptide content was obtained after combining all the individual measurements ($n=20$). The final result was corrected considering the UV-VIS purity of the fraction collected, obtaining a peptide mass purity of $62 \pm 2\%$ (1SD), which is in good agreement with the value previously obtained and also with the certified value.

Certification of a tryptic peptide. Finally, we applied both procedures to the analysis of a tryptic peptide from Cystatin C (ALDFAVGEYNK) in the frame of a parallel project in our laboratory for the determination of Cystatin C in human serum samples by IDMS using isotopically labelled peptides.¹⁴⁸ A natural abundance standard was purchased with a UV-VIS purity of 90.2 % according to the manufacturer. The peptide was further

purified by semi-preparative LC and the fraction corresponding to the peptide lyophilized and redissolved in pure water. This final solution was subjected to both analytical procedures: LC-oxidation-IDMS and FIA-oxidation-IDMS. Additionally, an aliquot was subjected to amino acid analysis.¹⁴⁸

Initially, the peptide standard solution was measured by FIA-oxidation-IDMS without any additional purification step. Thus, an aliquot of the standard was directly injected in the oxidation interface. The sequence of injections was as follows: firstly three injections of the KHP standard, followed by 5 injections of the peptide and finally, three more injections of KHP. The average response factor of the 6 injections of KHP was used to calculate the peptide concentration, giving a result of $494 \pm 11 \mu\text{g/g}$ (1 SD).

In parallel, another aliquot was analyzed using ion exchange chromatography. The LC was coupled directly to the oxidation interface, and a weak anion exchange column was used as both the peptide and the internal standard (KHP) have negative net charges, -1 and -2, respectively, at the pH of the mobile phase, (pH=7). Thus, in this case, the KHP could be mixed with the analyte for quantification purposes. The resulting mixture, containing roughly 56 ppm of each compound (as carbon), was subjected to five independent runs. One of the obtained chromatograms is shown in Figure 4. The baseline drift is caused by the gradient program and not by other eluting material, as can be seen from the overlapped blank signal. Using this procedure, the concentration found for the peptide was $477 \pm 11 \mu\text{g/g}$ (1 SD) which is only ca. 3% lower than the value obtained by FIA-oxidation-IDMS, demonstrating that the semi-preparative fraction collected was already pure.

For the same solution, the concentration obtained by amino acid analysis¹⁴⁸ was $490 \pm 7 \mu\text{g/g}$, which is in good agreement with the values obtained using the online carbon IDMS procedure.

CONCLUSIONS

We present here a novel method for the direct, accurate and precise absolute quantification of any water-soluble peptide without the need for specific standards.. The set up can be a good alternative to the amino acid analysis, the standard procedure for the mass purity assessment of peptide standards, which has some clear drawbacks such as extremely long analysis times, dedicated equipment and materials to carry out the acid hydrolysis, specific standards (isotopically-labeled when using isotope dilution mass spectrometry) and the requirement for relatively large amounts of essentially pure material. In our approach, the mass of the target peptide present in samples without purity requirements can be directly obtained after one single LC analysis using a primary standard such as KHP. This makes the results obtained directly traceable to the SI. It is expected that the current interest in green chromatographic methods will boost further the development of new stationary phases that allows direct peptide analysis without organic modifiers in the near future. Just in case, in order to tackle the current limitations that may arise from the requirement of 100% aqueous chromatography, an alternative procedure, consisting of two steps, reversed phase purification followed by FIA-on line C isotope dilution, has been also described for hydrophobic peptides. The validity of both approaches have been demonstrated by the analysis of a reference material and various synthetic standards, and by comparison of the results obtained with alternative techniques (AAA and ICPMS).

Of course, the proposed approach is not intended for the absolute quantification of peptides in complex samples because coelution of C-containing species must be avoided. However, the approach can be effectively applied to the determination of the very challenging mass purity assessment of peptide standards (isotopically labeled or not), which are massively and urgently needed nowadays to be used as internal standards in multiplexed absolute quantitative proteomics¹⁴⁹ using molecular mass spectrometry.

ASOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional information as noted in the text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

ACKNOWLEDGMENT

Dr. Clay Davis (National Institute for Standards and technology) is kindly acknowledged for the provision of the peptide reference standards and for his helpful discussion. Ana Gonzalez Antuña is greatly acknowledged for the provision of the Cystatine C peptide and technical advice. Agilent technologies is acknowledged for the loan of the ICP-QQQ instrument. The authors are grateful for financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through Projects Ref. CTQ2009-12814 and CTQ2012-36711. The UE is acknowledged for the provision of FEDER funds for the purchase of the LC-IRMS instrument. Sergio Cueto acknowledges the PTA-MICINN sub-program for financial support.

FIGURES

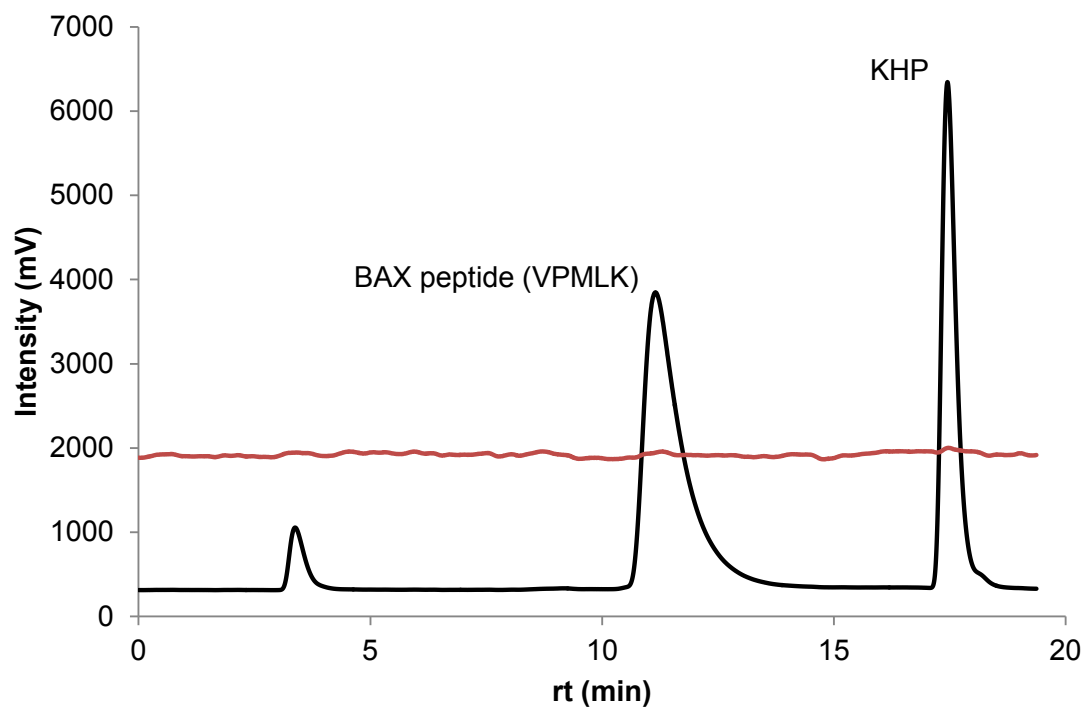


Figure 1. Carbon online isotope dilution chromatogram for the BAX peptide obtained by Strong Cation Exchange. The standard for quantification (KHP) was injected post-column. The red signal corresponds to the enriched ¹³CO₂ (m/z 45) used as spike.

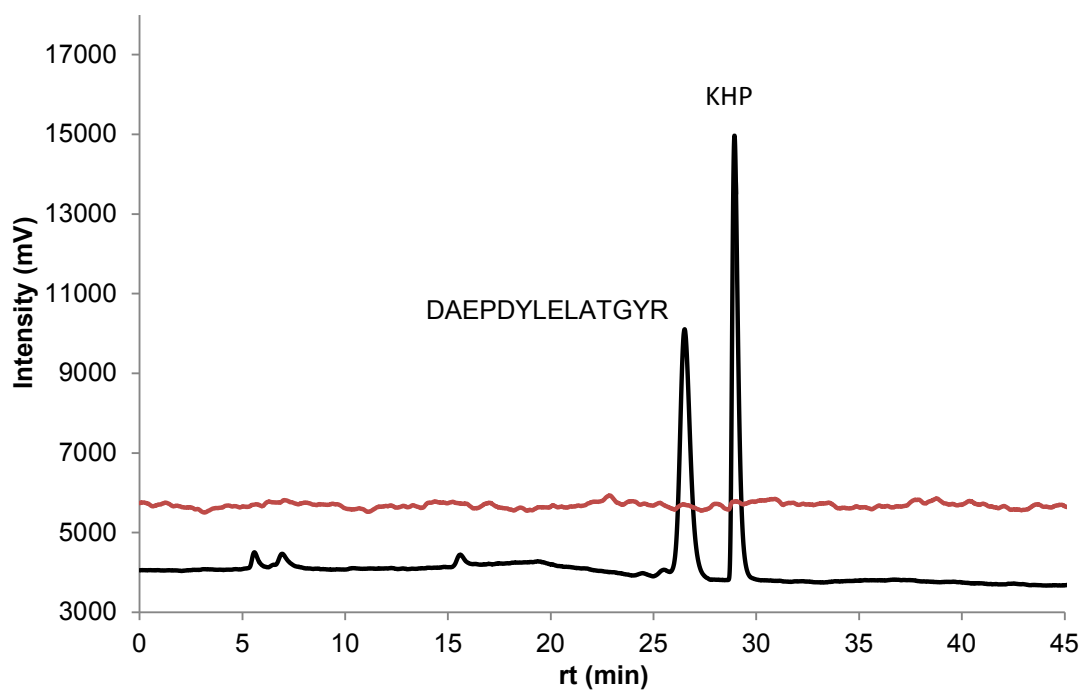


Figure 2. Weak Anion Exchange chromatogram of the NIST reference material 8327 (peptide A). Five different impurities were detected and resolved from the peak of interest.

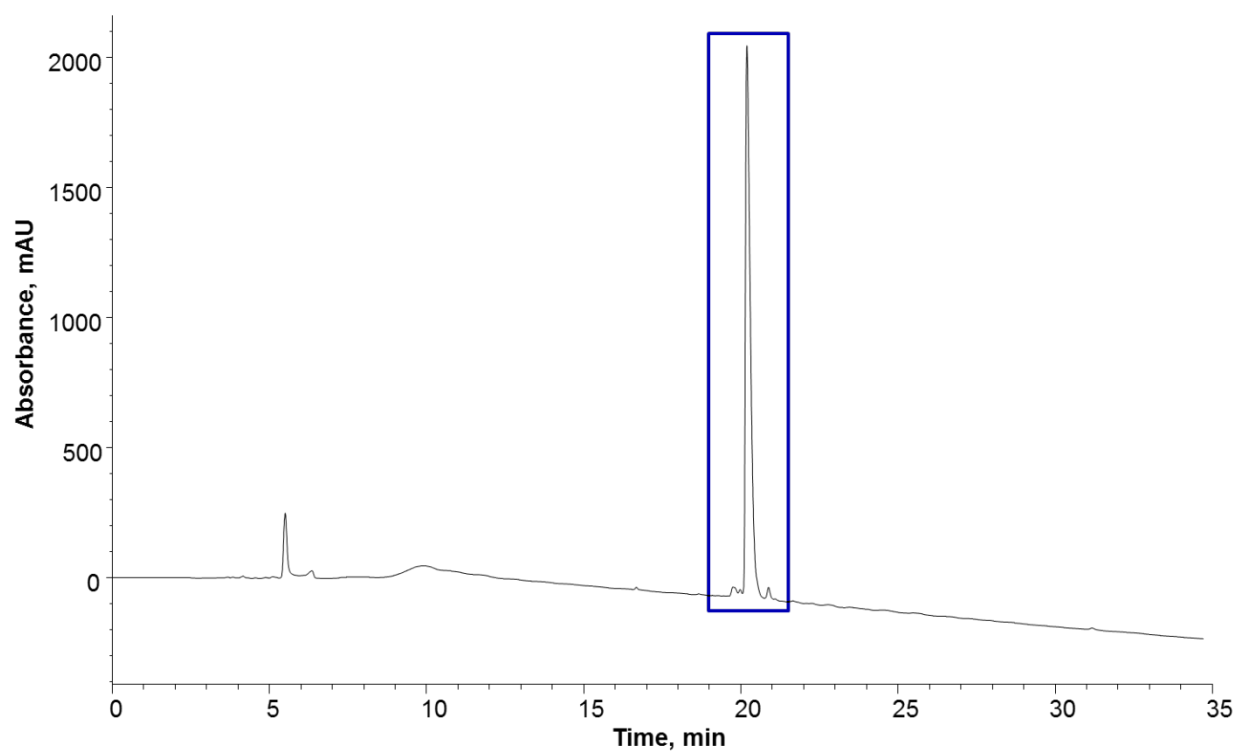


Figure 3. UV-VIS chromatogram of the peptide A obtained by reversed phase in a semi-preparative instrument. The fraction collected for the purity assessment is highlighted.

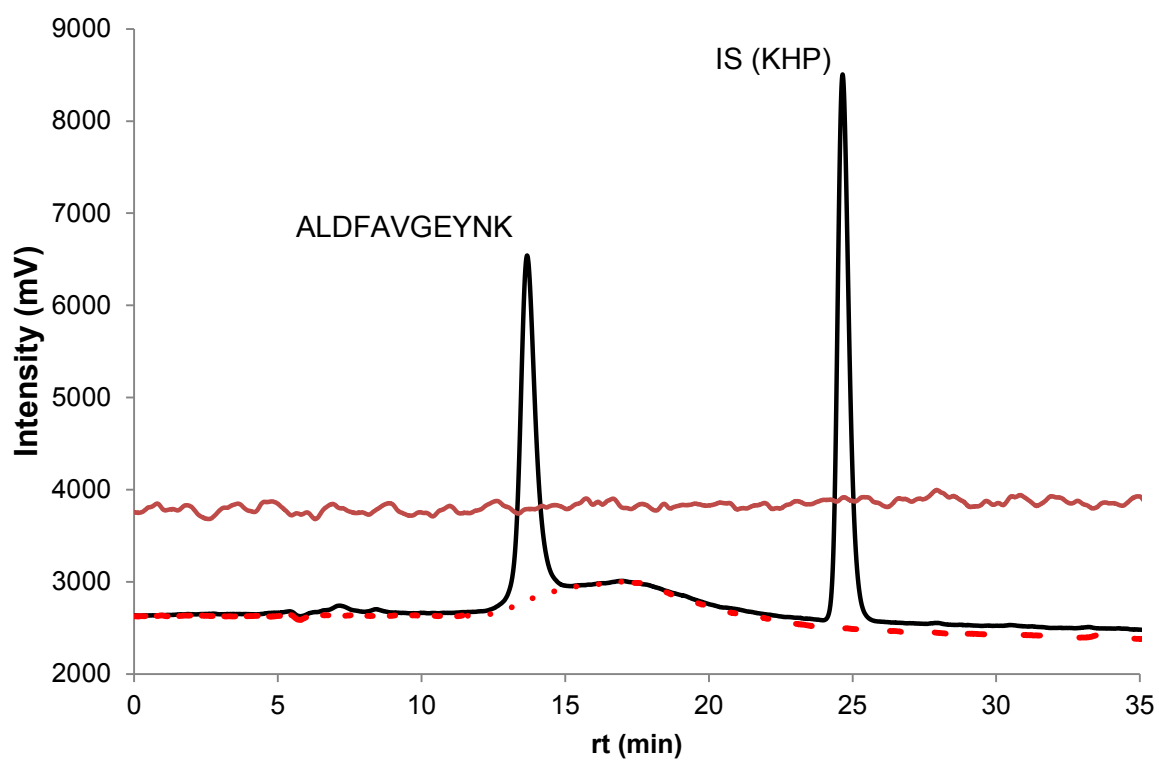


Figure 4. Online isotope dilution chromatogram of the purified Cystatin C proteotypic peptide T4. The red dotted line corresponds to a blank run. No related impurities were observed.

REFERENCES

¹ Bantscheff, M.; Lemeer, S.; Savitski, M. M.; Kuster, B. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 404, 939-965

² Report of Investigation Reference Material, 8327, National Institute of Standards and Technology (NIST)

³ Burkitt, W. I.; Pritchard, C.; Arsene, C.; Henrion, A.; Bunk, D.; O'Connor, G. *Anal. Biochem.* **2008**, 376, 242-251

⁴ Kuzyk, M. A.; Smith, D.; Yang, J.; Cross, T. J.; Jackson, A. M.; Hardie, D. B.; Anderson, N.L.; Borchers, C. H. *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, 8, 1860-1877

⁵ Lowenthal, M. S.; Yen, J.; Bunk, D. M.; Phinney, K. W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 397, 511-519

⁶ Muñoz, A.; Kral, R.; Schimmel, H. *Anal. Biochem.* **2011**, 408, 124-131

⁷ Pritchard, C.; Torma, F. A.; Hopley, C.; Quaglia, M.; O'Connor, G. *Anal. Biochem.* **2011**, 412, 40-46

⁸ Kinumi, T.; Goto, M.; Eyama, S.; Kato, M.; Kasama, T.; Takatsu, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 404, 13-21

⁹ Pereira Navaza, A.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, 46 (4), 569-571

¹⁰ Díez-Fernández, S.; Sugishama, N.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.*, **2012**, 84, 5851-5857

¹¹ Wind, M.; Wegener, A.; Eisenmenger, A.; Kellner, R.; Lehmann, W.D.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, 42, 3425-3427

¹² Zinn, N.; Hahn, B.; Pipkorn, R.; Schwarzer, D.; Lehmann, W. D.; *J. Proteom. Res.* **2009**, 8/10, 4870-4875.

¹³ Pereira Navaza, A.; Ruiz Encinar, J.; Ballesteros, A.; Gonzalez J.M.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 5390-5399.

¹⁴ Ahrends, R.; Pieper, S.; Kühn, A.; Weisshoff, H.; Hamester, M.; Lindemann, T.; Scheler, C.; Lehmann, K.; Taubner, K.; Linscheid, M. W. *Moll. Cell. Proteomics* **2007**, 6, 1907-1916.

¹⁵ Lui, R.; Hou, X.; Lv, Y.; McCooye, M.; Yang, L. ; Mester, Z. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 4087.

¹⁶ Fujinari, E. M.; Manes, J. D.; Bizanek, R. *J. Chromatogr. A* **1996**, 743, 85-89

¹⁷ Corens, D.; Carpentier, M.; Schroven, M.; Meerpoel, L. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1056, 67-75

¹⁸ Díaz, S. C.; Ruiz Encinar, J.; Sanz-Medel, A.; García-Alonso, J. I. *Anal. Chem.* **2013**, 85, 1873-1879

¹⁹ González Antuña A.; González-Rodríguez, P.; Ohlendorf, R.; Enrion, A.; Garcia Alonso J.I. In preparation.

²⁰ Mallick, P.; Schirle, M.; Chen, S. S.; Flory, M. R.; Lee, H.; Martin, D.; Ranish, J.; Raught, B.; Schmitt, R.; Werner, T.; Kuster, B.; Aebersold, R. *Nat.Biotechnol.* **2007**, 25, 125–131.

E. INFORME SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES PRESENTADAS

El trabajo desarrollado en la presente Tesis doctoral ha sido merecedor de publicación en revistas científicas de primer nivel tanto en el campo específico de la Química Analítica como en el campo de la Química general o multidisciplinar. Todas las publicaciones se encuentran en revistas internacionales indexadas en el JCR (Journal Citation Report), y dentro del primer cuartil de su categoría. En la tabla siguiente se muestran los datos de factor de impacto y categoría de las revistas en las que se pueden encontrar las publicaciones presentadas.

REVISTA	FI	CATEGORÍA	PUESTO	FUENTE
Angewandte Chemie Int.Ed.	11,829	Química/Multidisciplinar	5 de 140	JCR 2009
Analytical Chemistry	5,874	Química Analítica	3 de 73	JCR 2010
Analytical and Bioanalytical Chemistry	3,778	Química Analítica	13 de 73	JCR 2011
Analytical Chemistry	5,695	Química Analítica	3 de 73	JCR 2012

F. DISCUSIÓN INTEGRADORA

El objetivo global que se pretendió llevar a cabo durante la presente Tesis Doctoral, fue el desarrollo de nuevas metodologías analíticas que permitieran la cuantificación de compuestos orgánicos sin la necesidad de disponer de estándares específicos. Para ello se optó por la dilución isotópica en línea, una metodología que, hasta el momento, combinaba una técnica de separación y un sistema de detección elemental (ICPMS), con la adición post-columna de isótopos enriquecidos, tal y como ya se ha comentado. Esta técnica se ha utilizado mayoritariamente en el análisis de especiación de trazas metálicas, sin embargo, está bastante limitada para el análisis de sustancias orgánicas, ya que los elementos presentes mayoritariamente en la materia orgánica, C, H, N y O no son analizables mediante ICP. Durante la presente Tesis Doctoral se han desarrollado métodos de dilución isotópica en línea para la detección de carbono, principal constituyente de la materia orgánica, utilizando un trazador enriquecido en ^{13}C , ampliando el campo de aplicación de la dilución isotópica en línea, y por tanto la posibilidad de cuantificar la mayoría de compuestos orgánicos sin utilizar patrones específicos ni recurrir a la preparación de rectas de calibración.

Uno de los principales retos a superar a la hora de afrontar este objetivo fue el de diseñar una instrumentación adecuada. En principio, la fuente de ionización más indicada para la medida de carbono es la fuente de ionización electrónica, dado que trabaja a alto vacío y por tanto los fondos para este elemento son muy bajos, al contrario de lo que ocurre en fuentes de ionización a presión atmosférica, como el ICP. Sin embargo, la señal que se produce mediante ionización electrónica cambia en función de las características físico-químicas y estructurales de la especie a analizar y por tanto, no cumple uno de los requisitos imprescindibles para poder cuantificar por dilución isotópica en línea: la respuesta independiente del compuesto. Para solventar este problema se recurrió a la utilización de interfases de oxidación, de manera que los analitos una vez separados por cromatografía (LC ó GC), eran transformados cuantitativamente a dióxido de carbono, siendo ésta la única especie finalmente medida en el espectrómetro de masas, lo que garantizaba una respuesta homogénea, sólo dependiente del número de átomos de carbono presentes en la estructura molecular de los compuestos objeto de análisis. La instrumentación utilizada y/o modificada se ha detallado en el apartado C correspondiente a la parte experimental.

Se comenzó desarrollando la metodología para compuestos orgánicos volátiles y térmicamente estables. La cromatografía de gases es una de las mejores herramientas analíticas disponibles cuando se pretende analizar esta clase de compuestos debido a su gran poder de resolución, sensibilidad, cortos tiempos de análisis en general y a la posibilidad de acoplar múltiples sistemas de detección distintos. Sin embargo, exceptuando los detectores elementales ya mencionados, si se pretende obtener información cuantitativa, es necesario determinar los factores de respuesta del detector para cada una de la especies de interés mediante la calibración con estándares específicos. En los **artículos científicos I y II**, se desarrolla y evalúa por primera vez la metodología de dilución isotópica en línea, con fuente de ionización molecular, para la detección de carbono como sistema de detección genérico y cuantitativo en cromatografía de gases, sin tener que recurrir al uso de patrones de cuantificación específicos ni a la elaboración de rectas de calibrado. En el **artículo científico I** se presenta el desarrollo inicial y las primeras pruebas analíticas realizadas. Para el desarrollo se partió de un instrumento de gases-masas comercial con fuente de impacto electrónico, que se modificó incluyendo una interfase de combustión, una válvula de 6 vías y un sistema de dosificación de CO₂ enriquecido en ¹³C tal y como ya se ha comentado. Se optimizaron las condiciones de medida para minimizar la incertidumbre en la medida de la relación isotópica y se evaluaron las características analíticas mediante la cuantificación, utilizando un único patrón genérico, de mezclas modelo de estándares, obteniéndose buenos resultados en términos de exactitud (-7% a +5%) y precisión (<6% RSD, n=3), para mezclas de diferentes familias de compuestos orgánicos (Figura 17, Tabla 2). En cuanto al límite de detección, se obtuvo un valor adecuado de 0,8 pgC/s (equivalente a 3 pg de tetradecano utilizando un volumen de inyección de 1 µL), comparable al de un detector FID o al de un masas en modo scan, y siendo casi tres órdenes de magnitud más bajo que los calculados para carbono mediante dilución isotópica en línea con detección por ICPMS (0,7 ngC/s). El factor que más influencia presenta sobre el límite de detección es la señal de fondo, la cual se origina principalmente a través de pequeñas entradas de aire por las distintas conexiones del sistema, así como de restos de la cola del disolvente. Es de esperar que con una mejora en el diseño instrumental, esta señal de fondo se minimice y por tanto el límite de detección se reduzca considerablemente.

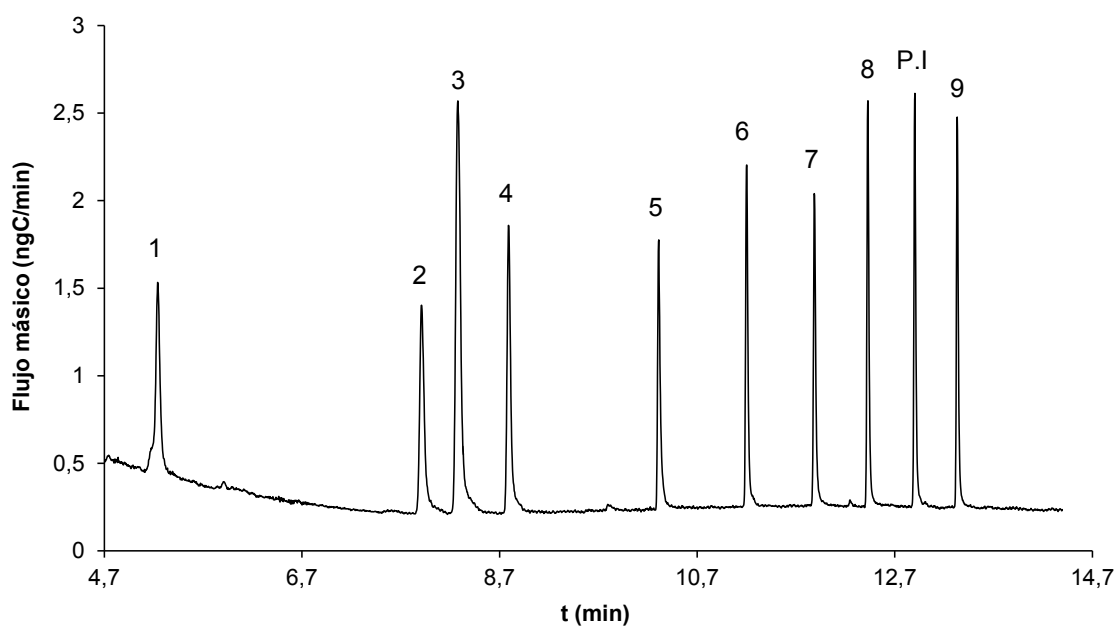


Figura 17. Cromatograma de flujo másico de una mezcla modelo de distintas familias de compuestos orgánicos (BTEX, n-alcanos y ésteres. Ver Tabla 1).

Tabla 2. Resultados de la cuantificación de la mezcla modelo (n=5).

Nº pico	Compuesto	Hallado	Esperado	%R
1	Tolueno	5,7±0,3	6,1	93±5
2	Etilbenceno	5,9±0,3	6,1	97±5
3	<i>o,p</i> -Xileno	12,3±0,7	12,2	101±6
4	<i>m</i> -Xileno	6,2±0,3	6,1	101±5
5	Butanoato de butilo	5,9±0,3	5,6	105±5
6	Undecano	5,0±0,3	4,7	106±6
7	Butanoato de hexilo	5,6±0,2	5,6	100±4
8	Tridecano	5,3±0,2	5,1	104±4
9	Tetradecano	4,8±0,2	4,9	98±4

A la vista de los resultados, se puede concluir que el método desarrollado tiene potencial como sistema de detección cuantitativo para cromatografía de gases, permitiendo la cuantificación de los analitos de interés sin necesidad de recurrir a

patrones de calibración específicos, con el consiguiente de ahorro en tiempo y coste por análisis. Sólo son necesarias unas pocas modificaciones sencillas sobre un GC-MS comercial que, además, no afectan en ningún caso al funcionamiento habitual de un equipo de estas características ya que, mediante la válvula de 6 vías implementada, se puede dirigir el flujo que proviene de la columna directamente a la fuente de ionización electrónica para por ejemplo, proceder a la identificación de los compuestos de interés a través de su espectro de fragmentación. De esta manera se puede convertir la cantidad de carbono hallada en cada pico detectado en cantidad de compuesto. Esto supone una ventaja adicional frente a los otros métodos de dilución isotópica en línea que emplean fuentes de ionización elemental, en donde la información molecular se pierde, siendo necesario recurrir a técnicas alternativas para identificar o confirmar las especies presentes en la muestra.

Un sistema de cuantificación con estas características, se presenta como una herramienta valiosa no sólo para la cuantificación de mezclas de compuestos, sino también para el estudio y optimización de etapas de preparación de muestra, tales como extracciones o pre-concentraciones. Dado que la integración de cada pico cromatográfico proporciona directamente la cantidad de compuesto que eluye (en masa), se pueden realizar, de manera directa y rápida, estudios cuantitativos de dichos procesos. En el **artículo científico II**, además de una descripción detallada del desarrollo y la optimización del sistema, se discute la aplicabilidad del método a la evaluación cuantitativa de etapas de preparación de muestra, tomando como modelo la microextracción en fase sólida, en la modalidad de espacio de cabeza (HS-SPME), para la extracción y pre-concentración de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenceno y o,m,p-xileno). La microextracción en fase sólida es una técnica frecuentemente utilizada, en combinación con cromatografía de gases, que permite la extracción y concentración de analitos mediante una fibra de sílice recubierta de una fase estacionaria. Los distintos compuestos se van extrayendo en la fibra hasta que se alcanza el equilibrio entre la fase vapor y la fibra en este caso. Posteriormente se liberan de la misma por desorción térmica en el propio inyector del cromatógrafo de gases. Puede utilizarse en dos modalidades distintas conocidas como inmersión directa, si la fibra se introduce en la propia disolución de la muestra para extraer los analitos, o en espacio de cabeza, si la

extracción se produce en la fase gas existente dentro del recipiente de la muestra. En la Figura 18 se muestra el proceso de análisis mediante esta técnica.

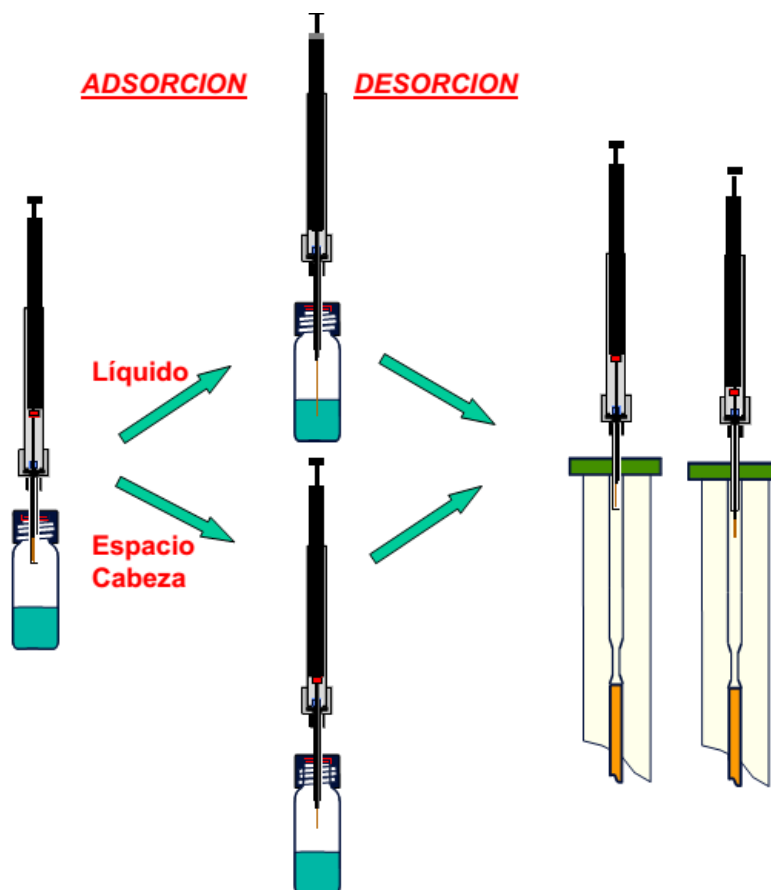


Figura 18. Esquema del proceso de análisis por microextracción en fase sólida

Además la SPME es una técnica que introduce cantidades de disolvente muy pequeñas en el cromatógrafo, lo cual resulta ideal para el sistema GC-combustión-IDMS desarrollado ya que redundará en fondos más bajos y por tanto, en mejores límites de detección.

Un parámetro importante a la hora de optimizar y validar un método de HS-SPME es el cálculo de las recuperaciones absolutas, es decir la cantidad de analito que queda retenido sobre la superficie de la fibra en unas condiciones determinadas. Sin embargo, obtener esta información en SPME no es un proceso sencillo debido a las particularidades de la técnica. Determinar de forma absoluta la cantidad de analito extraída, implica normalmente la realización de una calibración externa mediante

inyección convencional (con jeringa) para los distintos compuestos de interés. Para calcular las recuperaciones absolutas de esta manera, debe suponerse que la eficacia de la transmisión de los analitos desde el inyector a la columna es la misma cuando la muestra se introduce en forma líquida mediante una jeringa que cuando la introducción se realiza mediante la fibra, lo cual no tiene por qué ser siempre cierto ya que son procesos distintos, gobernados por variables diferentes.

Mediante el método GC-combustion-IDMS desarrollado, la cantidad de analito (en masa) retenido en la fibra en unas condiciones determinadas, puede calcularse directamente por integración del pico cromatográfico correspondiente en el cromatograma de flujo másico y de ahí la recuperación absoluta, conociendo la cantidad de dicho analito presente inicialmente en la muestra. De este modo se determinaron las recuperaciones en disoluciones estándar de 10ppb de BTEX, para tres fibras comerciales de distinta polaridad (ver Tabla 3). La fibra con recubrimiento de PDMS (polidimetilsiloxano) es la más apolar, mientras que la mezcla DVB/CAR/PDMS (divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano) es la menos apolar de las tres, ocupando un lugar intermedio la fibra de PDMS/DVB (polidimetilsiloxano/divinilbenceno). Para obtener un dato más preciso en la comparación se calcularon también las constantes de partición fibra/disolución para cada analito, ya que este parámetro tiene en cuenta el volumen total del recubrimiento de la fibra, el cual cambia ya que el espesor de fase estacionaria es distinto en función del tipo de fibra. Los resultados obtenidos, que concuerdan con los encontrados en la bibliografía, pueden verse en la Tabla 4. Cabe destacar que sólo nueve análisis por HS-SPME (un triplicado por cada fibra) fueron necesarios para obtener esta valiosa información.

Tabla 3. Fibras utilizadas en el estudio comparativo

Recubrimiento	Polaridad	Espesor (μm)	Volumen (mm^3)
PDMS	Apolar	100	0,612
PDMS/DVB	Intermedia	65	0,357
DVB/CAR/PDMS	Intermedia	80	0,494

Tabla 4. Constantes de partición fibra/disolución para BTEX en tres tipos diferentes de fibras

Compuesto	Valores de K_{fs} (n=3)		
	PDMS	PDMS/DVB	CAR/PDMS/DVB
Benceno	170±10	3800±100	5700±400
Tolueno	430±40	10200±50	9200±500
Etilbenceno	900±100	11380±40	9400±400
m,p-Xileno	1000±100	11960±80	10500±500
o-Xileno	1400±100	14100±300	12200±400
1,2,4-Trimetilbenceno	2500±400	12900±800	10700±300

Aunque en general se habla de la SPME como de una técnica de extracción no exhaustiva, dependiendo del tipo de analito a determinar y de su nivel de concentración, puede ocurrir que la cantidad de compuesto extraída sea considerable con respecto al total presente en la muestra. Éste es el caso de los BTEX en aguas, donde tal y como demuestran sus elevadas constantes de partición de la Tabla 4, su afinidad por la fibra es muy elevada con la excepción del benceno. Por esta razón se realizó un experimento consistente en la extracción completa de los BTEX mediante sucesivas extracciones de un mismo vial (Figura 19), utilizando la fibra de PDMS/DVB. De este modo se puede validar internamente la exactitud del método para la obtención de recuperaciones absolutas en HS-SPME, dado que la suma de la cantidad de analito extraída en las distintas extracciones, debería de coincidir con el total presente en la disolución inicialmente, siempre que los compuestos se extraigan cuantitativamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Cantidades de analito extraídas de un mismo vial en sucesivas etapas. Las recuperaciones se calcularon como el porcentaje entre la cantidad total de analito extraída con respecto a la cantidad inicial de la disolución

Analito	Cantidad total de analito (ng)	Cantidad extraída en cada etapa (ng)				Total	%R
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a		
Benceno	151,7	27,7	21,8	14,9	16,7	88,2	58
Tolueno	154,6	80,9	34,5	11,3	6,9	146,7	95
Etilbenceno	154,9	102,1	20,5	4,5	3,0	143,8	93
<i>m,p</i> -Xileno	309,9	203,1	40,1	9,1	6,9	286,6	92
<i>o</i> -Xileno	154,6	125,9	25,2	4,9	3,5	160,4	104
Trimetilb.	158,2	109,7	11,5	3,5	3,9	143,2	91

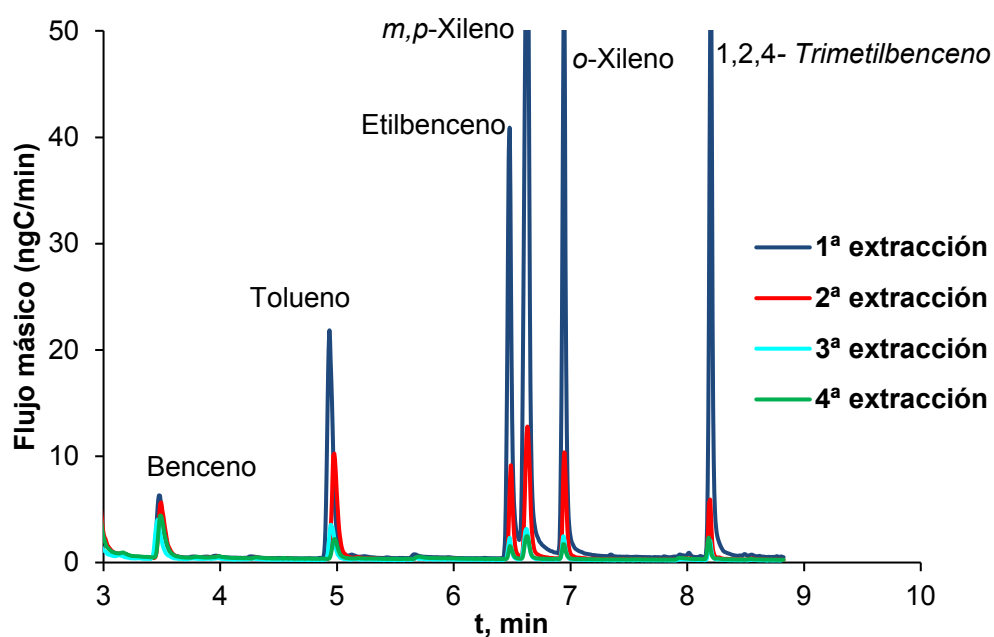


Figura 19. Cromatograma de sucesivas extracciones mediante HS-SPME de una disolución de 20ppb de BTEX

Como se puede observar, las recuperaciones obtenidas fueron cuantitativas para todos los compuestos después de sólo 4 etapas de extracción con la fibra, a excepción del benceno, tal y como era de esperar de acuerdo a la constante de partición calculada para este compuesto, cuatro veces inferior a las obtenidas para el resto de BTEX.

Por último se analizaron muestras reales de aguas tanto de agua de grifo como de agua de ríos de Asturias (Nalón y Narcea). Las aguas fueron fortificadas con una disolución patrón de BTEX a nivel de 5ppb ya que no se detectó la presencia de estos compuestos. Se aplicaron los valores de recuperación de la fibra obtenidos para las disoluciones patrón y se calcularon las recuperaciones del método, las cuales fueron cuantitativas, descartándose por tanto, la presencia de interferencias de matriz.

El método GC-C-IDMS desarrollado se muestra como una herramienta muy útil a la hora de evaluar y optimizar etapas de preparación de muestra, tal y como se desprende de los resultados obtenidos para el ejemplo concreto de microextracción en fase sólida en espacio de cabeza. La principal ventaja es que estos procesos pueden ser estudiados cuantitativamente, de manera sencilla y rápida, ya que la cantidad absoluta de compuesto extraído se obtiene directamente de la integración del cromatograma de flujo másico, no siendo necesario realizar calibrados externos. En el caso concreto de la SPME el método podría resultar de gran utilidad a la hora de desarrollar y optimizar nuevos tipos de recubrimiento.

Una vez optimizado y evaluado el método de dilución isotópica en línea de carbono para sustancias volátiles y térmicamente estables, se comenzó con el desarrollo de un método análogo de cuantificación sin patrones específicos pero aplicado a aquellos compuestos orgánicos que no pueden ser analizados por GC. En este caso tanto los compuestos de interés como el trazador estarán en fase acuosa y no en fase gas como en el caso anterior. La idea de partida era la misma, la transformación de los analitos y del trazador a CO₂ y ¹³CO₂ respectivamente, y la posterior medida de la relación isotópica en un espectrómetro de masas con fuente de ionización electrónica. En el **artículo científico III** se describen los primeros pasos relativos a la validación de la cuantificación de CO₂ disuelto en agua mediante dilución isotópica en línea. Para ello se desarrolló una metodología que permitiera la formación de CO₂ en disolución acuosa, su posterior extracción a una fase gas y la cuantificación por dilución isotópica en línea del dióxido de carbono generado. Se construyó un sistema de análisis por inyección en flujo que permitía generar dióxido de carbono en disolución de manera muy sencilla, a partir de inyecciones de un patrón primario de carbonato en un flujo acuoso a pH ácido (ver apartado C.3). El trazador utilizado (bicarbonato enriquecido en ¹³C), se adicionaba

en continuo mediante una bomba peristáltica adicional. La validación del método para la cuantificación de CO_2 disuelto se llevó a cabo mediante el análisis de un material de referencia certificado. Este material de referencia consistía en un agua de mar certificada en carbono inorgánico disuelto (DIC), y fue proporcionado por el “Scripps Institution of Oceanography” de California. Para la cuantificación se utilizó un patrón primario de carbonato sódico como patrón de cuantificación (pureza $>99,95$). El material de referencia se inyectó directamente en el sistema FIA ($n=5$, ver Figura 20), sin ningún tratamiento previo, obteniéndose un valor de $24,19 \pm 0,19$ ppm, expresadas como carbono, que estaba en perfecta concordancia con el valor certificado (24,16 ppm), y con una precisión adecuada del 0,8%.

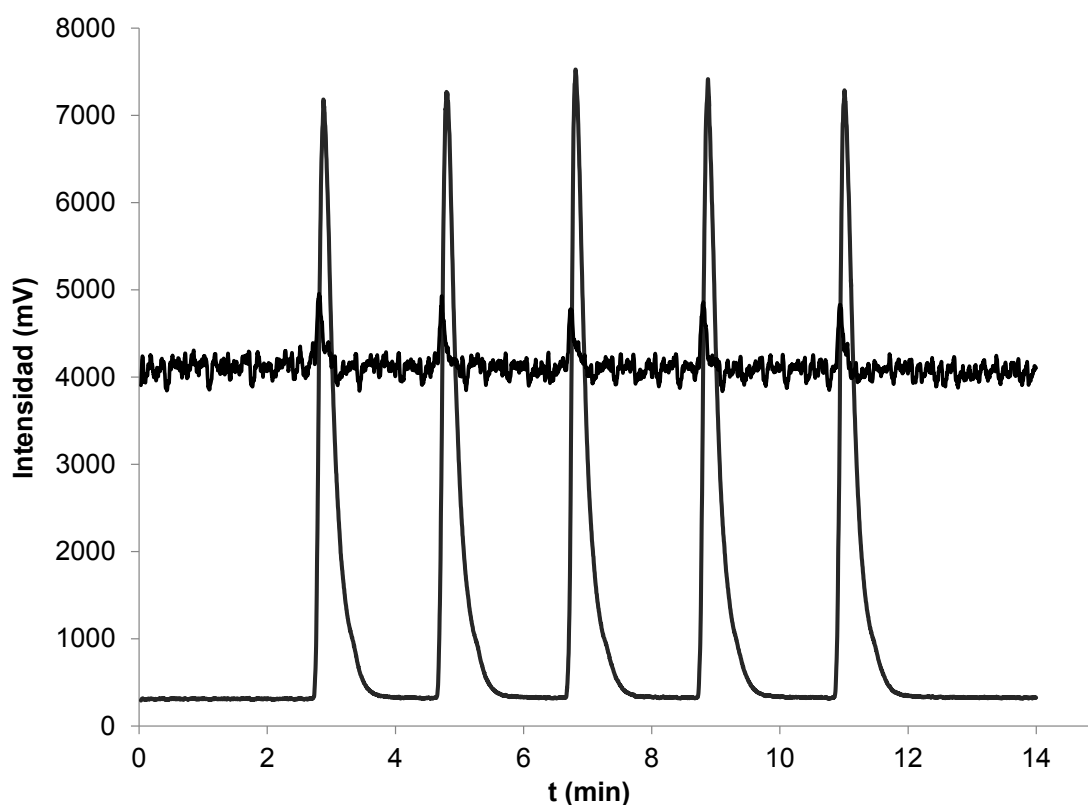


Figura 20. Diagrama de intensidades de 5 inyecciones del material de referencia certificado en DIC

La excelente concordancia obtenida entre el valor certificado y el obtenido demuestra la idoneidad del método desarrollado para la determinación de dióxido de carbono presente en disolución acuosa.

Tras verificar que es posible determinar CO_2 disuelto con exactitud y precisión mediante dilución isotópica en línea, el siguiente paso consistió en la optimización y evaluación del método para la cuantificación de compuestos orgánicos solubles en agua. En este caso el CO_2 presente en disolución se genera a partir de la oxidación de los compuestos orgánicos de interés mediante reacción con persulfato sódico en medio ácido a 99°C , tal y como se describe en el apartado C.3. La cuantificación se realiza con respecto a un patrón primario de ftalato ácido potásico (KHP), lo cual permite la trazabilidad directa de los resultados al Sistema Internacional de Unidades (SI).

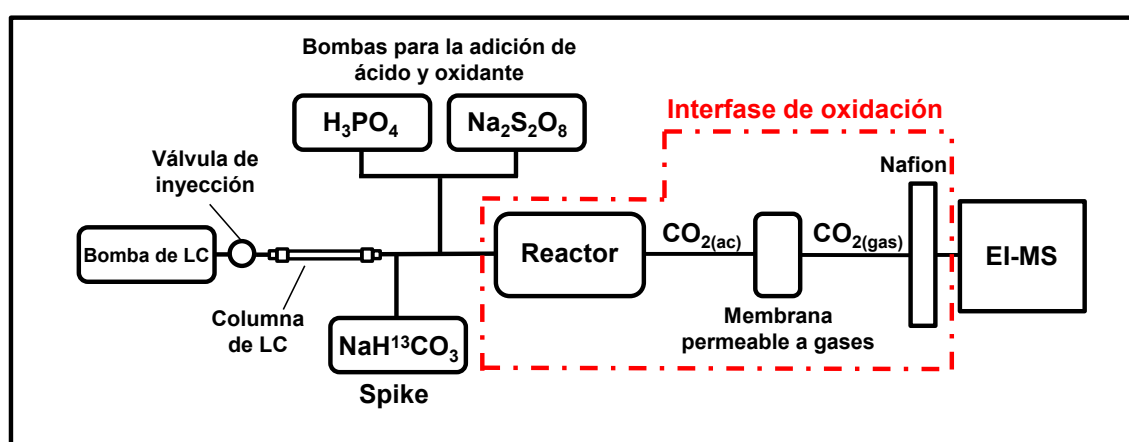


Figura 21. Esquema de la instrumentación utilizada para la cuantificación de compuestos orgánicos polares mediante dilución isotópica en línea de carbono.

Teniendo en cuenta la ingente cantidad de compuestos químicos orgánicos existentes ya caracterizados (se estima que del orden de 13,5 millones), así como el elevado número de nuevas moléculas que se sintetizan continuamente en distintos campos, es evidente que disponer de estándares certificados para todos ellos es prácticamente imposible. Por tanto un sistema de detección para cromatografía líquida que permitiera la cuantificación de analitos orgánicos utilizando un único patrón genérico, sería de gran utilidad en el desarrollo y caracterización de compuestos de nueva síntesis (p.ej. fármacos). Por otro lado, una de las aplicaciones de mayor interés de un método de estas características sería la determinación trazable de la pureza de sustancias orgánicas puras, un área en el que cada vez se hace mayor hincapié desde los centros de metrología de todo el mundo. Normalmente la determinación de la pureza de un estándar se realiza bien de manera directa, determinando la cantidad de componente

principal mediante un método primario, o bien indirecta, determinando las distintas impurezas que pueda tener el estándar, tal y como se ha comentado en la introducción. La determinación indirecta requiere del uso de distintas técnicas (cromatografía, Karl-Fisher, ICPMS, etc...) para estimar las diferentes impurezas del componente principal (compuestos relacionados, disolventes residuales, trazas metálicas y humedad). Además la exactitud es tanto peor cuanto más se aleje la pureza del estándar del 100%. Es por esta razón por la que desde los centros de metrología se demanda cada vez más el desarrollo de nuevos métodos directos para la determinación de la pureza de estándares orgánicos, ya que el número es muy escaso, siendo la determinación por RMN cuantitativa el más utilizado.

En el **artículo científico IV** se describe en detalle el estudio y la optimización del método para la cuantificación sin patrones específicos de compuestos orgánicos polares de bajo peso molecular. En este caso la instrumentación utilizada consistió en un equipo comercial para medida de relaciones isotópicas de carbono (LC-IRMS), el cual ya cuenta con una interfase que permite oxidar los analitos que eluyen de la columna y su posterior separación del CO₂ generado. Como ya se ha detallado anteriormente (ver Figuras 15 y 16, págs. 73 y 75), las modificaciones realizadas fueron la inclusión de un conector en “T” a la entrada de la interfase, a través del cual se adicionaba el spike mediante una bomba de alta precisión, y el cambio de amplificación en una de las copas de Faraday del espectrómetro de masas, para que las señales correspondientes a las relaciones m/z 44 y 45 fueran del mismo orden.

Para poder obtener resultados cuantitativos exactos y precisos, es requisito imprescindible que la oxidación del compuesto a analizar sea completa. Por este motivo, se evaluó el método mediante el análisis en FIA de distintos patrones puros certificados de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, empleando las condiciones de oxidación recomendadas por el fabricante del equipo (0,3M de persulfato sódico y 1,5M de ácido fosfórico a un flujo de 50 µL/min, para un flujo de carrier de 300 µL/min, con una temperatura del reactor de 99,9°C). Para la cuantificación se realizaron 5 inyecciones de ftalato ácido de potasio seguidas de otras 5 inyecciones del compuesto/s a determinar. En la Figura 22 puede verse a modo de ejemplo el FIAgrama obtenido para el ácido cítrico.

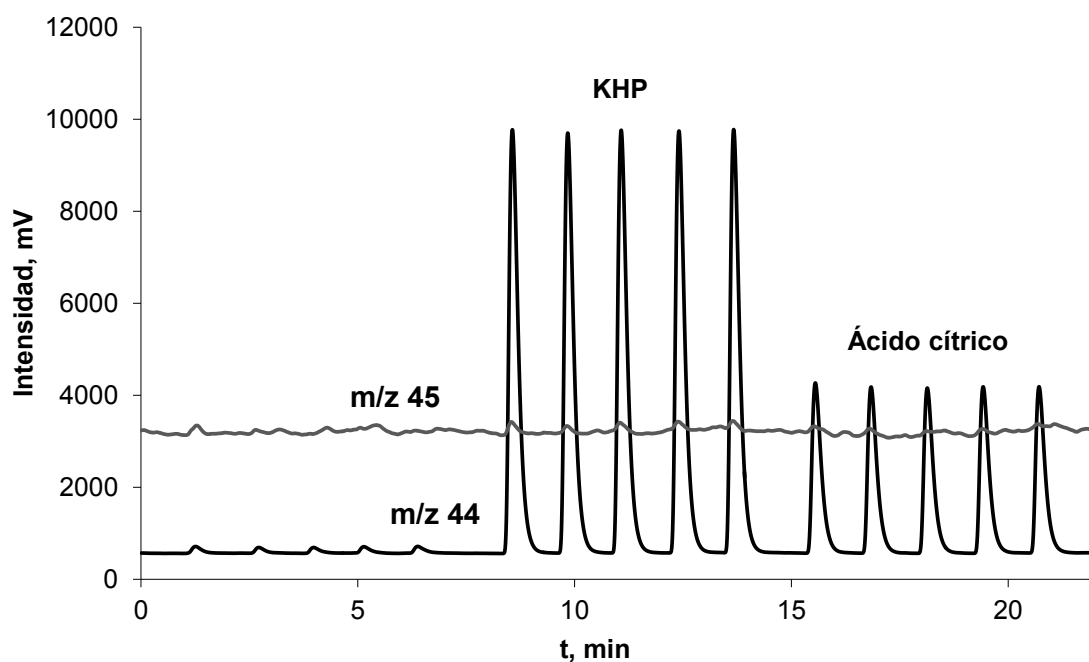


Figura 22. Fiagrama de intensidades de la determinación de un estándar de ácido cítrico por FIA-oxidación-IDMS

Los resultados experimentales obtenidos para muchos de los compuestos ensayados concordaban bien con los valores esperados, tal y como queda reflejado en la Tabla 6.

Tabla 6. Patrones analizados cuya recuperación fue cuantitativa

Compuesto	Esperado ($\mu\text{g C/g}$)	Recuperación (%)
1,4-benzoquinona	49,7 \pm 0,8	100 \pm 2
Sacarosa	43,1 \pm 0,6	100 \pm 1
Ácido cítrico	18,9 \pm 0,5	100 \pm 3
Cisteína	14,2 \pm 0,1	99 \pm 1
Metionina	45,1 \pm 0,4	100 \pm 1
Lisina	24,5 \pm 0,3	96 \pm 1
Prolina	26,2 \pm 0,5	100 \pm 2

Sin embargo se obtuvieron recuperaciones inesperadamente bajas para los compuestos indicados en la Tabla 7. Dado que la única etapa de preparación previa a la medida consistió simplemente en la disolución del patrón en agua, esta desviación de los resultados se achacó a una oxidación incompleta de estos compuestos. La forma habitual de verificar que la oxidación se produce de manera cuantitativa en el campo de medida de relaciones isotópicas de carbono, es realizar un estudio de linealidad. Sin

embargo, en este caso en particular, las rectas de calibración que se obtuvieron para estas sustancias eran perfectamente lineales.

Tabla 7. Compuestos analizados cuyas recuperaciones no fueron cuantitativas debido a una oxidación incompleta

Compuesto	Recuperación (%)
Arginina	83±3
Guanidina	36±2
Creatina	78±3
Hexazinona	76±1
Adenina	41±1
Guanina	52±7
Uracilo	53±1

Examinando la estructura de estas sustancias se observó que todos ellos tenían enlaces C-N conjugados. En la siguiente figura puede verse la estructura molecular de tres de los compuestos problemáticos.

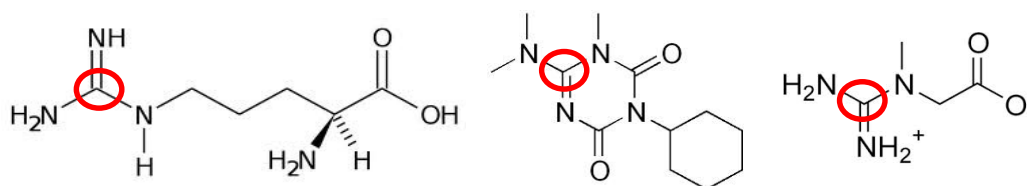


Figura 23. Estructuras moleculares de arginina, hexazinona y creatina (de izquierda a derecha)

Tal y como se puede observar la arginina presenta un carbono unido por conjugación a tres átomos de nitrógeno (grupo guanidinio). Si suponemos que ese carbono en cuestión no se oxida a CO₂ en el reactor (un carbono del total de 6 que tiene la molécula), la recuperación teórica esperada sería $5/6 \times 100 = 83,3\%$, que coincide perfectamente con el valor obtenido. Del mismo modo para creatina y hexazinona las recuperaciones teóricas que se obtienen suponiendo la no oxidación de los carbonos unidos a nitrógeno, serían del 75% en ambos casos, coincidiendo nuevamente con los resultados obtenidos para estos compuestos (ver Tabla 6). Para demostrar inequívocamente esta suposición, se utilizó un estándar de creatina marcada isotópicamente en el carbono guanidínico (¹³C 99% de enriquecimiento). Teniendo en cuenta que los otros tres carbonos de la molécula presentan abundancia isotópica natural

(^{12}C 98,9%), la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ para este compuesto, si la oxidación fuese cuantitativa, sería cercana a 3 (1 carbono marcado de 4 en total que tiene la molécula). La relación obtenida experimentalmente sin embargo fue de $12,0 \pm 0,2$, lo que indica que sólo un 22% del carbono guanídico era oxidado. Se evaluaron distintas condiciones de oxidación, variando la concentración del oxidante, adicionando catalizadores metálicos y disminuyendo los flujos con el objetivo de aumentar el tiempo de permanencia de los analitos en el reactor, siendo estas dos últimas variables las que tuvieron un efecto mayor en el porcentaje de oxidación de los analitos (ver Figura 24 y Tabla 7). Al disminuir los flujos de trabajo, lo cual equivale a aumentar el tiempo de reacción, la recuperación obtenida para creatina aumenta, desde el 78% hasta el 94%. La adición de trazas de nitrato de plata en la fase ácida, permitió obtener una recuperación cuantitativa, que se ve confirmada por el valor de la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ en la gráfica, que coincide con el valor teórico de 3. Bajo estas condiciones también se obtuvieron recuperaciones cuantitativas para el resto de compuestos enumerados en la Tabla 7. A la vista de estos resultados se concluye también que un estudio de linealidad, aunque aceptado comúnmente, no es un experimento adecuado para evaluar si la oxidación es o no cuantitativa para un determinado compuesto. En este caso la oxidación incompleta de ciertas sustancias sólo pudo ser observada gracias a la información cuantitativa que proporciona el método desarrollado.

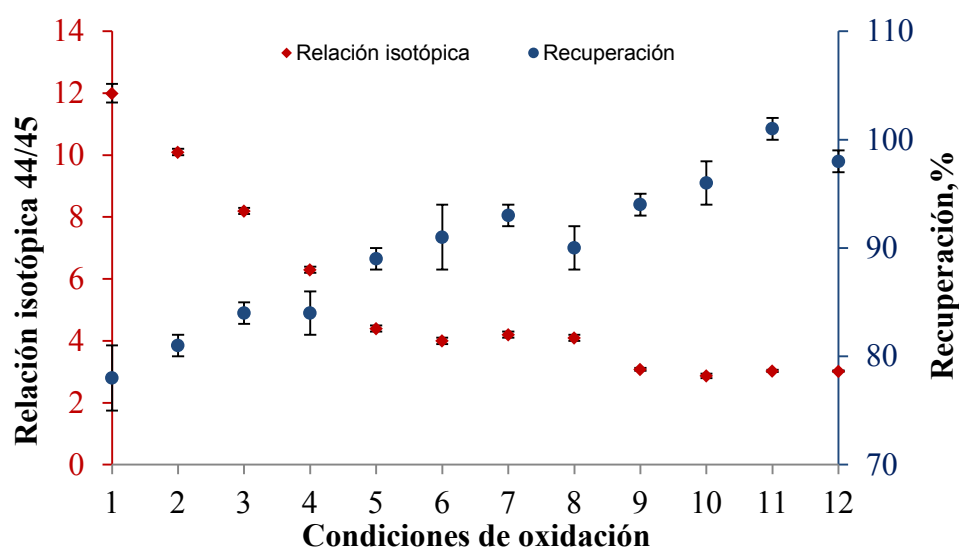


Figura 24. Variación de la relación isotópica $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ y de las recuperaciones para un estándar de creatina marcada en ^{13}C en función de las condiciones de oxidación (Tabla 7)

Tabla 8. Recuperaciones obtenidas para creatina utilizando diferentes condiciones de oxidación

Condiciones de oxidación	Flujo de carrier	Flujo de oxidante	Flujo de ácido	Recuperación (%)
1	300	50	50	78±3
2	240	40	40	81±1
3	180	30	30	84±1
4	120	20	20	84±2
5	60	10	10	89±1
6	60	20	20	91±3
7	60	30	30	93±1
8	40	7	7	90±2
9	40	10	10 ^a	94±1
10	40	20	20 ^a	96±2
11	40	10	10 ^b	101±1
12	40	20	20 ^b	98±1

a 100ppm Ag⁺ b 200ppm Ag⁺

Por último, dado que tanto para la determinación de la pureza de un estándar como para llevar a cabo un análisis cuantitativo en general, es necesaria una etapa cromatográfica, se evaluó el potencial del método como sistema de detección cuantitativo en cromatografía líquida. Debido al propio fundamento en que se basa el método, es evidente que debe evitarse el uso de modificadores orgánicos así como de otro tipo de aditivos que contengan carbono. A pesar de esta importante limitación, existe un buen número de compuestos de interés que pueden ser analizados mediante cromatografía utilizando fases móviles 100% acuosas.

Para la evaluación se cuantificó una mezcla de 4 aminoácidos certificados que habían sido analizados previamente de forma individual por FIA (ver Tabla 6). Se utilizó una columna mixta (intercambio catiónico y fase reversa) y se utilizó un gradiente de ácido sulfúrico para la elución, obteniéndose una buena resolución y un buen perfil de pico para todos los compuestos. Los resultados obtenidos en la cuantificación fueron satisfactorios, obteniéndose recuperaciones por encima del 96% para todos los compuestos que concordaban perfectamente con los datos experimentales obtenidos por FIA, quedando probada la capacidad del método desarrollado para cuantificar de forma exacta y precisa analitos que eluyen de un sistema cromatográfico sin tener que utilizar patrones específicos ni calibración externa.

Una vez concluida la optimización y la evaluación con distintos estándares, con el propósito de validar el método para la determinación de pureza de sustancias orgánicas puras, se solicitó la participación en el ejercicio de inter-comparación CCQM-P117c, “Determinación de la pureza química de L-Valina”. Este ejercicio se realizó en paralelo y con la misma muestra que el CCQM-K55c, el cual está restringido únicamente a centros de metrología.

La habilidad para llevar a cabo la determinación de la pureza de patrones químicos orgánicos se considera una de las competencias técnicas más importantes para aquellos laboratorios que pretenden dar resultados trazables en análisis orgánico. Con el objetivo de demostrar la competencia técnica de los laboratorios en la determinación de la fracción en masa del componente principal en un material orgánico de elevada pureza, desde 2001 el CCQM ha organizado diferentes ejercicios de inter-comparación, seleccionando materiales de estudio representativos dentro del campo del análisis orgánico tal y como puede verse en la Figura 25.

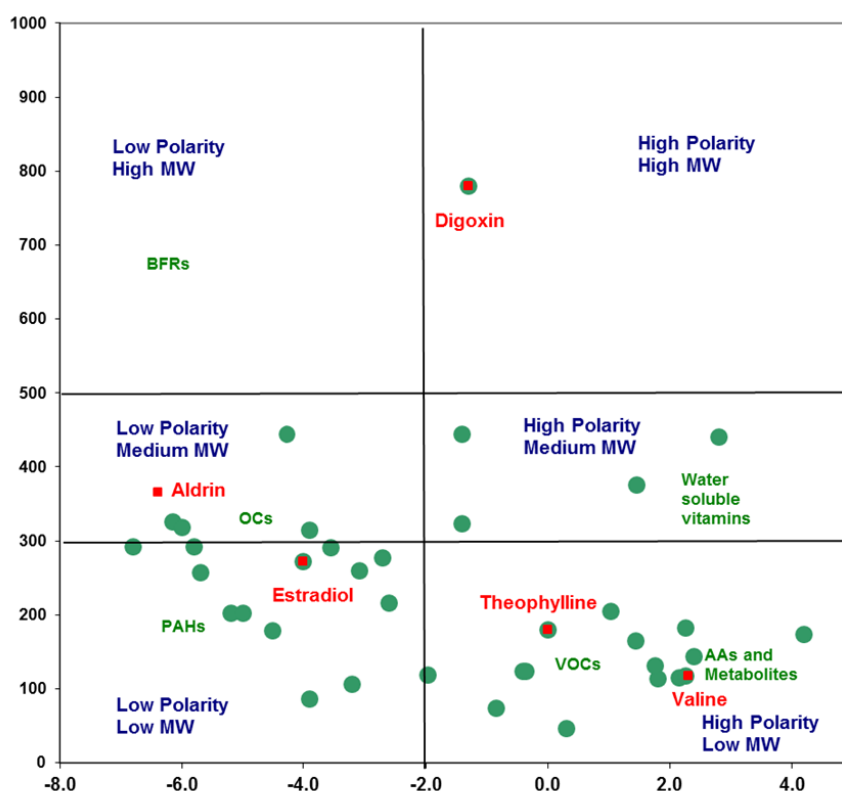


Figura 25. Compuestos representativos en análisis químico orgánico clasificados en función de la polaridad y del peso molecular. En rojo los compuestos seleccionados para la realización de ejercicios de inter-comparación

En el caso concreto del ejercicio CCQM-p117.c se seleccionó el aminoácido l-valina como sustancia representativa de compuestos orgánicos de bajo peso molecular y elevada polaridad. De acuerdo con el CCQM, los resultados de esta inter-comparación deben de ser indicativos de la capacidad del laboratorio para la determinación de la pureza de compuestos orgánicos estructuralmente sencillos (peso molecular 100-300) y de elevada polaridad (coeficiente octanol/agua, $pK_{ow} > -2$). El ejercicio se llevó a cabo entre los meses de Abril y Agosto de 2012. A falta aún de un informe definitivo y la asignación del valor certificado de pureza, se adjunta el informe inicial de resultados entregado a los laboratorios participantes (apartados D.3.1 y D.3.1.1). La asignación de la pureza por parte de los laboratorios se llevó a cabo bien por balance de masa (determinación de las impurezas) o bien de manera directa mediante qRMN o valoración. Algunos de los participantes emplearon ambas estrategias (directa e indirecta) en la determinación, tal y como se describe en el informe.

El método LC-oxidación-IDMS desarrollado en la presente Tesis doctoral, se engloba dentro de los métodos directos, determinándose la cantidad de componente principal sin tener en cuenta las distintas impurezas que puedan estar presentes en el sólido. Una vez recibido el material se optimizó la separación cromatográfica para obtener una buena resolución del componente principal de sus distintas impurezas relacionadas. En la Figura 26 puede verse una ampliación del cromatograma obtenido para una disolución de aproximadamente 2000 ppm del estándar de l-valina.

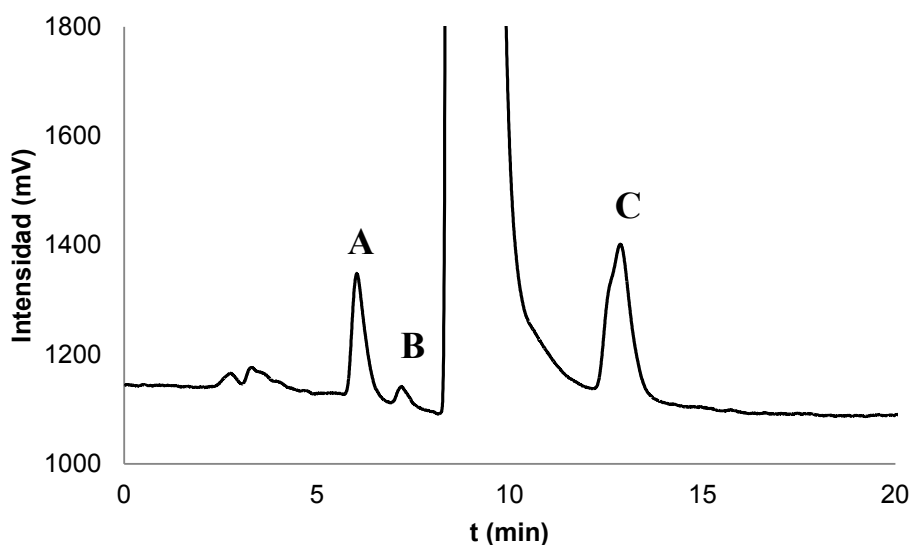


Figura 26. Cromatograma de las impurezas detectadas para el material de l-valina

Las condiciones utilizadas para la separación se resumen en la Tabla 9. Tal y como se puede observar, además del pico correspondiente al componente principal se ven otros tres picos (A, B y C en la figura), debidos a la presencia de impurezas. Se recogieron las fracciones correspondientes al componente principal y a cada una de las impurezas y se analizaron mediante LC-ESI-QqQ-MS. De esta manera se lograron identificar las impurezas A y C como ácido aminobutírico y leucina respectivamente. La impureza B no pudo ser identificada.

Tabla 9. Condiciones cromatográficas optimizadas para el análisis de l-valina

Muestra	Estándar de l-valina
Columna	Sielc Primesep A (RP+SCX)
Fase A	100% H ₂ O
Fase B	0,2% (v/v) H ₂ SO ₄
Gradiente	80:20 1min De 80:20 a 0:100 en10min
Temperatura	40 °C
Flujo	300 uL/min

Con el objetivo de descartar la co-elución con la l-valina de otras posibles especies presentes en el material, se cogió la fracción completa correspondiente al pico de valina, y tras liofilizar y redisolverse se analizó mediante ESI-Q-TOF. Tal y como se puede observar en el espectro de la Figura 27, no se detectó la presencia de ningún otro compuesto en dicha fracción. Las señales mayoritarias observadas se corresponden con el ion molecular (118,0889), el ion imonio (72,0822), la pérdida de los grupos carboxilo y amino (55,0543) y el aducto con sodio (140,0711).

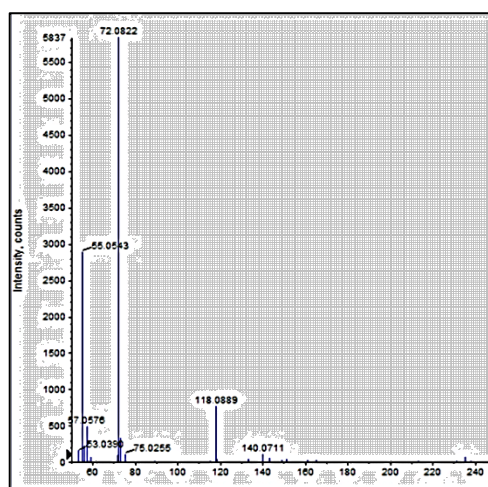


Figura 27. Espectro de masas (ESI-q-TOF, 0-500 m/z) de la fracción de l-valina. No se observa la presencia de otros iones aparte de las señales correspondientes al compuesto de interés.

Para asignar el valor de pureza se siguió la siguiente estrategia. Se prepararon seis mezclas independientes del estándar de l-valina y del patrón interno de ftalato ácido potásico pesando aproximadamente 50 mg de cada sustancia en balanza de 5 cifras. De esta manera los resultados cuantitativos obtenidos son directamente trazables a un patrón primario y por tanto, al Sistema Internacional de unidades. A partir de estas mezclas se prepararon también por pesada tres disoluciones de aproximadamente 50 ppm de cada sustancia, expresadas como carbono, y otras tres de 100 ppm. Cada una de las seis disoluciones se analizó por quintuplicado bajo las condiciones mencionadas anteriormente, teniendo un total de $n=30$ medidas del material. En la Figura 28 se muestra a modo de ejemplo un cromatograma correspondiente a una mezcla de l-valina y ftalato que contiene 50 ppm de cada compuesto (expresadas como ppm de carbono).

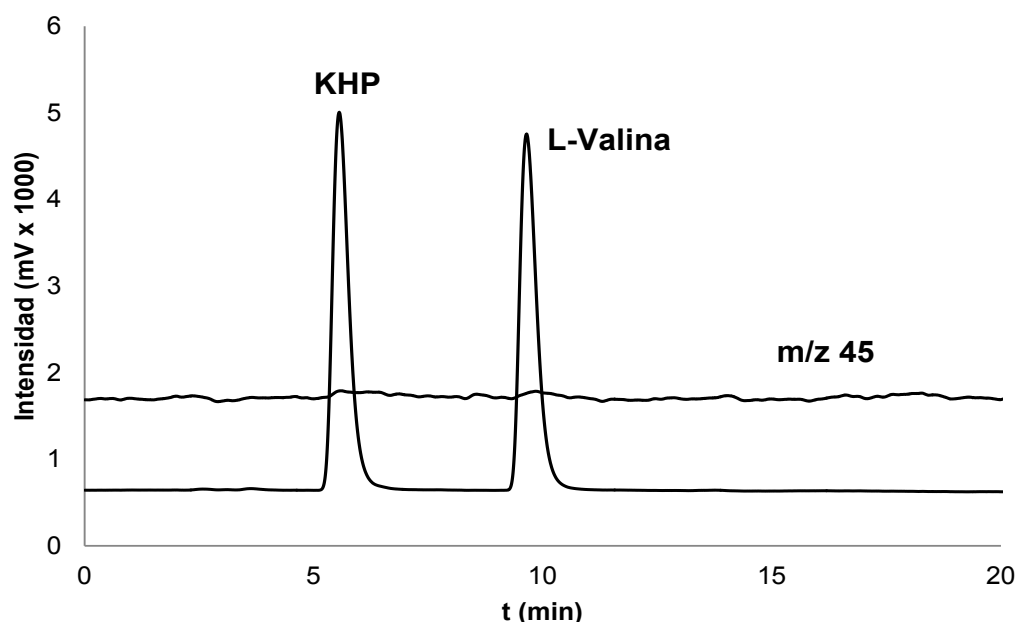


Figura 28. Cromatograma de la mezcla de l-valina y ftalato ácido de potasio utilizada para la determinación de la pureza del aminoácido

El valor de pureza obtenido fue de $992,5 \pm 0,86$ ($k=2$) expresado en miligramos de valina por gramo de material ($99,2 \pm 0,8\%$ en tanto por ciento). En la Figura 29 se muestra el gráfico con los valores asignados por los distintos laboratorios participantes tanto en el CCQM-K55.c como en el CCQM-P117.c. La Universidad de Oviedo se corresponde con el **laboratorio 8** del CCQM-P117.c. A la vista de los resultados, y a falta aún de un valor de consenso para el material, se puede concluir que el valor

obtenido por LC-oxidación-IDMS concuerda bien con los valores hallados por la mayoría de laboratorios participantes. Como contrapunto cabe destacar que el valor calculado para la incertidumbre se encuentra entre los más altos, indicando la necesidad de trabajar en la mejora de la precisión del método.

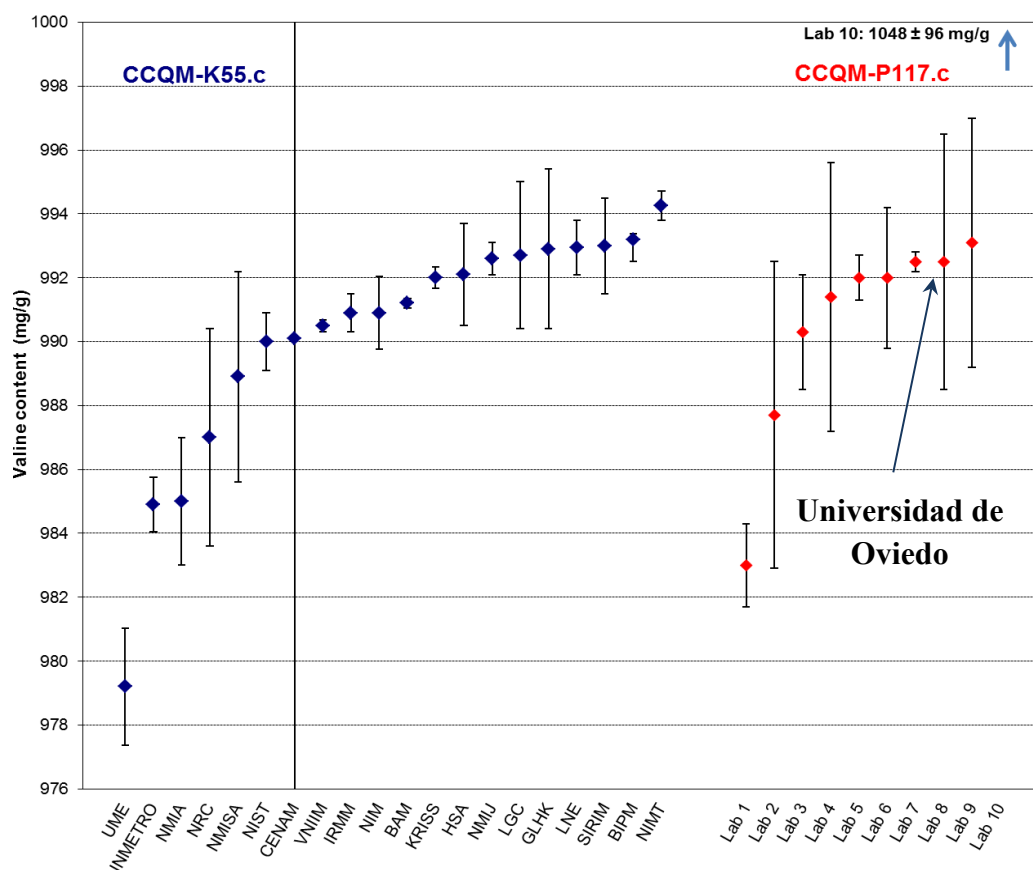


Figura 29. Contenido en valina asignado por los laboratorios participantes en el CCQM-K55.c (en azul) y en el CCQM-P117.c (en rojo).

Cabe resaltar la elevada disparidad en los resultados obtenidos mediante RMN cuantitativa, considerada la técnica de referencia para la determinación directa de la pureza de sustancias orgánicas, los cuales varían entre 981 y 996 mg/g, de acuerdo con el informe. Este hecho demuestra la dificultad que entraña la asignación de la pureza de compuestos orgánicos, incluso de aquellos de estructura sencilla y elevada pureza como en este caso, y pone de manifiesto la necesidad real de desarrollar nuevos métodos que permitan la determinación de la pureza de estándares orgánicos.

Por último, tras la puesta a punto y validación del método desarrollado para la certificación de pureza de sustancias orgánicas de bajo peso molecular, se evaluó su potencial en la determinación de pureza en masa de péptidos sintéticos, moléculas de mayor peso molecular y para las que el número de patrones certificados disponibles es muy escaso a pesar de la gran demanda que existe debido principalmente a su utilización como estándares en proteómica cuantitativa.

Para cuantificar una o varias proteínas concretas en una muestra, una de las estrategias más utilizadas consiste en utilizar como estándar de cuantificación un péptido tríptico, marcado isotópicamente, característico de cada una de las proteínas de interés. El estándar análogo marcado se adiciona a la muestra en cantidad conocida y se realiza la digestión tríptica de la misma, liberándose de este modo el péptido natural proveniente de la proteína. La cantidad de proteína de interés presente en la muestra de determina mediante la relación de señales entre el péptido proveniente de la digestión de la proteína y el análogo marcado, asumiendo que la digestión de la proteína es completa. Por tanto la exactitud y precisión de la cuantificación dependerá en gran medida de la disponibilidad de un estándar caracterizado adecuadamente.

Sin embargo, la obtención de péptidos sintéticos de elevada pureza, libres de otras impurezas tanto peptídicas como no peptídicas (sales) y con un grado de hidratación conocido, es muy difícil y en muchas ocasiones imposible. Por ello la determinación de la pureza en masa del péptido es crítica. Por el contrario, únicamente una estimación de la pureza de un péptido sintético mediante porcentaje de área utilizando LC con detección UV-VIS no será suficiente para conocer la pureza real del mismo, ya que muchas de las impurezas que acompañan a un péptido patrón no generan señal en este detector o bien presentan una sensibilidad muy distinta de la del componente principal. Por todo ello, para caracterizar adecuadamente un péptido sintético y obtener así una cuantificación exacta, debe de determinarse el contenido en péptido, es decir debe de cuantificarse la cantidad de péptido en el patrón sintético. Normalmente esta determinación se realiza mediante análisis de aminoácidos tal y como ya se ha explicado anteriormente. La determinación por análisis de aminoácidos es un proceso largo y complejo que requiere de un control cuidadoso de la etapa de hidrólisis química para, por un lado, conseguir que la reacción se complete totalmente y, por otro, evitar

la degradación de los aminoácidos liberados. Además son necesarios estándares marcados isotópicamente de los aminoácidos involucrados para realizar una cuantificación exacta y precisa. Si además se quiere obtener un resultado trazable, es necesario adquirir patrones de abundancia natural certificados de dichos aminoácidos. Igualmente debe tenerse en cuenta que el método no distingue el péptido de interés de otras impurezas peptídicas que puedan estar presentes, ya que éstas también liberarán aminoácidos durante la hidrólisis, con lo cual deben analizarse estándares de elevada pureza o bien debe realizarse previamente un análisis de impurezas (LC, CE o MALDI), y utilizar el dato de porcentaje en área para corregir el resultado obtenido mediante análisis de aminoácidos. Debido a la complejidad y a las múltiples posibles fuentes de error que presenta el análisis de aminoácidos, el método desarrollado en la presente tesis doctoral podría constituir una buena alternativa en la certificación trazable de la pureza en masa de péptidos sintéticos.

En el **artículo científico V** se recogen los resultados obtenidos en la determinación de la pureza en masa de estándares de péptidos mediante LC-oxidación-IDMS. El procedimiento en este caso es el mismo que el comentado anteriormente para la separación y cuantificación de la mezcla de aminoácidos. El péptido se diluye en agua o en un buffer inorgánico adecuado y se inyecta en el cromatógrafo de líquidos, en donde se separa el pico de interés de sus posibles impurezas. A continuación se introduce el flujo del trazador y se produce la oxidación en la interfase, la cual está acoplada en línea con el cromatógrafo. Por último se mide la relación isotópica $^{12}\text{CO}_2/^{13}\text{CO}_2$ en el espectrómetro de masas. El patrón interno de cuantificación puede adicionarse en la propia disolución del péptido o bien inyectarlo post-columna durante el cromatograma.

Para la evaluación del método se utilizaron tres péptidos sintéticos distintos, uno comercial de bajo peso molecular (BAX inhibiting peptide v5, VPMLK, MW: 586,3); un péptido triptico real (péptido T4 de la proteína Cistatina C, ALDFAVGEYMK, MW: 1225,6) y un material de referencia certificado (NIST 8327), compuesto por tres péptidos liofilizados certificados en pureza en masa, de los cuales se utilizó el péptido A (DAEPDILELATGYR, MW: 1561,76). Dado que a excepción del material de referencia, los péptidos utilizados no estaban certificados en pureza, la validación de los resultados en estos casos se llevó a cabo por comparación con otras técnicas.

Debido a la limitación del método en lo que al uso de modificadores orgánicos se refiere, se optó por la cromatografía de intercambio iónico para las etapas de separación, ya que la elución de los analitos se produce mediante gradiente de sales, no siendo obligatoria la utilización de disolventes orgánicos. Para el péptido BAX, se utilizó una columna de intercambio catiónico fuerte (Thermo Biobasix SCX, 100x1mm) ya que es un péptido de carácter básico ($pI=10,1$), mientras que para los otros dos péptidos, ambos de carácter ácido ($pI=4,07$ y $3,59$ respectivamente), se obtuvo una buena resolución utilizando una columna de intercambio aniónico débil (Tosoh TSKgel DEAE-2SW, 250x2mm).

Para las primeras evaluaciones se utilizó el péptido BAX, un péptido de pequeño tamaño para el que era esperable obtener una buena cromatografía en condiciones 100% acuosas y una recuperación completa de la columna. El sólido se disolvió en agua y se cuantificó la disolución mediante el método desarrollado, obteniendo un valor de concentración para el péptido de $655\pm 15 \mu\text{g/g}$ (1SD, $n=15$). Para contrastar el valor obtenido, se analizó otra alícuota de la disolución mediante ICPMS, aprovechando que el estándar tenía un átomo de azufre en su estructura debido a la metionina. Se realizó un primer análisis mediante LC-ICPMS utilizando cromatografía de fase reversa, para descartar la presencia de impurezas con azufre y a continuación se cuantificó la disolución por FIA-ICPMS, y utilizando un patrón certificado de metionina para la calibración de la señal. Se obtuvo una concentración de $638\pm 20 \mu\text{g/g}$ (1SD, $n=5$), que concuerda bien con el resultado obtenido por LC-oxidación-IDMS.

Para validar el método se analizó el material de referencia NIST RM8327. De los tres péptidos sintéticos que componen este material, se seleccionó el péptido A, con un valor certificado de pureza en masa de $69\pm 11\%$ ($k=4,303$), ya que constituye un buen ejemplo de péptido tríptico. El valor certificado fue obtenido mediante una compleja metodología que incluye un análisis de aminoácidos en combinación con medidas de absorción UV-VIS del péptido en disolución. Por un lado la pureza del péptido se determinó mediante un análisis de aminoácidos convencional, realizando una digestión del péptido en HCl 6M a 150°C durante 90 minutos, y utilizando dos patrones internos, norvalina y sarcosina, para corregir posibles pérdidas de material durante la digestión de la muestra. A continuación los aminoácidos se derivatizaron con o-ftalaldehído (OPA) o

con 9-fluorometil-cloroformiato (FMOC) y se determinaron mediante LC utilizando dos sistemas de detección, UVVIS y fluorescencia. Paralelamente se realizaron medidas de absorción en ultravioleta en disoluciones acuosas del péptido. Se calculó la absorbancia neta a 280nm, restando la absorbancia obtenida a 350nm de la obtenida a 280nm, y el valor se comparó con el teórico calculado en función de la secuencia de aminoácidos del péptido, para obtener la pureza en masa del péptido.

Mediante el método propuesto en la presente tesis doctoral, la asignación de la pureza en masa se realiza de manera directa tras la puesta en disolución en agua del material liofilizado. Se preparó una disolución de aproximadamente 150 $\mu\text{g/g}$ de péptido y se midió por quintuplicado. El estándar interno se inyectó post-columna dado que co-eluía con el péptido. Se obtuvo un valor de pureza de $61\pm 2\%$ (1SD), el cual está dentro del intervalo de confianza del certificado. Cabe destacar que la columna de intercambio aniónico utilizada en este caso permitió obtener un buen perfil de pico cromatográfico para el péptido en condiciones 100% acuosas, así como una buena resolución de las impurezas relacionadas tal y como puede verse en la Figura 30.

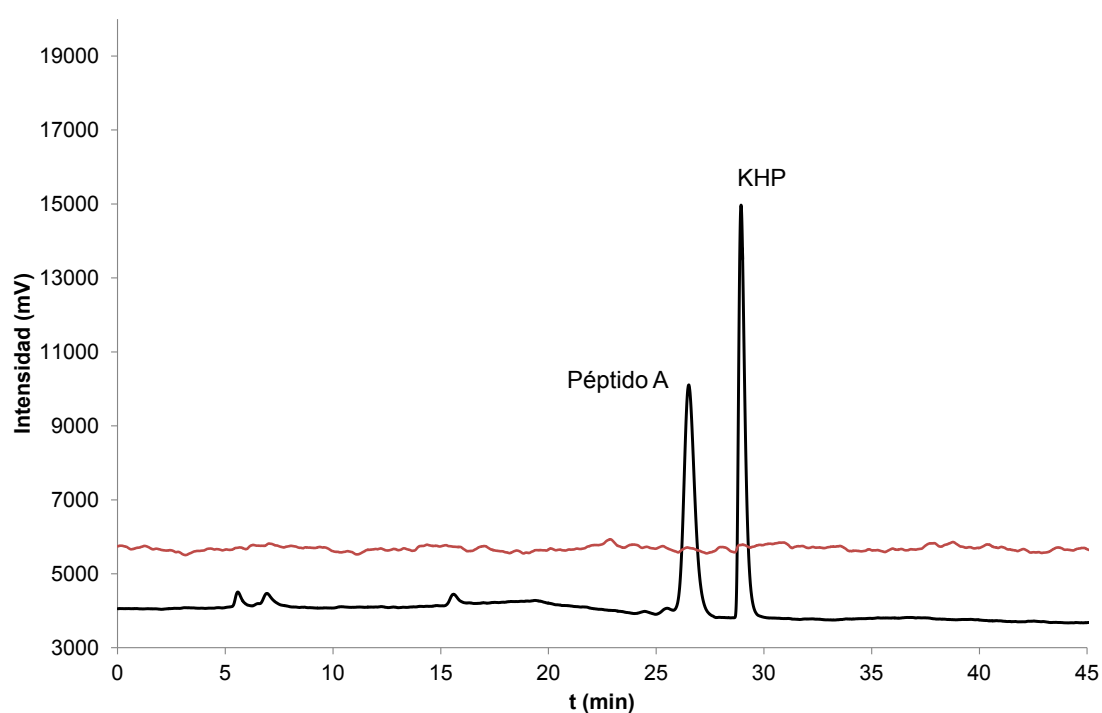


Figura 30. Cromatograma obtenido por intercambio aniónico del material RM8327 (péptido A). El estándar de cuantificación (KHP) se inyectó post-columna tras la elución del péptido.

Los péptidos pueden tener propiedades físico-químicas muy distintas en función de la secuencia de aminoácidos que los componen. Por ello es previsible que no sea posible para todos los casos, tener una buena cromatografía sin utilizar modificadores orgánicos, requisito imprescindible en el método desarrollado. Por esta razón se propuso un método alternativo al método directo ya explicado, en el que la etapa de separación cromatográfica se lleva a cabo en un instrumento de LC semipreparativo. Se recoge la fracción de interés y tras evaporar a sequedad, se redisuelve en agua o buffer y se inyecta directamente en la interfase de oxidación para determinar la cantidad del compuesto. Al separar la cromatografía de la detección, es posible seleccionar y optimizar las condiciones de la separación sin las restricciones del método directo en cuanto al uso de disolventes orgánicos, los cuales son eliminados en la etapa de evaporación previa a la medida. Para la validación se determinó de nuevo el péptido A del material de referencia NIST RM8327. Un vial con el material liofilizado (1mg) se disolvió en agua ultrapura (1mL) y se inyectó (100 μ L) en un equipo de LC semipreparativa utilizando una columna de fase reversa y acetonitrilo como modificador orgánico. Se recogió la fracción correspondiente al péptido de manera que la totalidad del compuesto eluido fuese transferida al vial de recolección. Es esencial evitar cualquier pérdida de compuesto durante esta etapa ya que en este caso concreto, el certificado de pureza está referido al material sólido de partida. Cada una de las cuatro fracciones recogidas, se llevó a sequedad para eliminar el modificador orgánico, se redisolvió en agua y se inyectó por quintuplicado en la interfase de combustión para determinar la cantidad de péptido presente. El estándar de cuantificación (KHP), se inyectó por triplicado. El valor de pureza obtenido fue de $62\pm 2\%$, que concuerda perfectamente con el hallado anteriormente mediante el método directo y también con el valor certificado.

Por último tras haber validado ambas alternativas, se procedió a la certificación de un péptido tróptico real, en concreto el péptido T4 de la proteína Cistatina C (ALDFAVGEYMK, MW: 1225,6). El compuesto se adquirió como sólido liofilizado con una pureza UV-VIS $>80\%$, y se purificó en el laboratorio mediante RP-LC semipreparativa, cogiendo sólo la parte central del pico cromatográfico para eliminar las impurezas que habitualmente eluyen en el frente y en la cola de estos estándares sintéticos. Una alícuota de la disolución purificada se envió a un laboratorio experto

(PTB, Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Alemania) para certificar la concentración de péptido por análisis de aminoácidos y dilución isotópica. El valor asignado por el PTB, $490,0 \pm 7,1 \mu\text{g/g}$ se tomó como valor de referencia. Otra alícuota de esta disolución se determinó mediante FIA-oxidación-IDMS, inyectando directamente en la interfase de oxidación, y además, para descartar completamente la presencia de otras impurezas, se determinó adicionalmente incluyendo una etapa de cromatografía por intercambio aniónico. Los valores de concentración obtenidos fueron $494,1 \pm 10,8 \mu\text{g/g}$ y $476,5 \pm 10,9 \mu\text{g/g}$ (1 SD) respectivamente, siendo ambos valores estadísticamente indistinguibles entre sí y del valor tomado como referencia.

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que el método de dilución isotópica en línea de carbono permite determinar la pureza real (en tanto por ciento en masa) de estándares de péptidos de una manera rápida, sencilla, exacta y precisa. Además la trazabilidad del método queda asegurada ya que la cuantificación se realiza con referencia a un patrón primario. El método puede constituir una buena alternativa, mucho más rápida, al análisis de aminoácidos a la hora de certificar la pureza de péptidos para su posterior uso como estándares de cuantificación, o como técnica complementaria para confirmar los resultados obtenidos por AAA.

G. CONCLUSIONES

Como conclusión general del trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral se puede decir que es posible extender el concepto de dilución isotópica no específica (en línea) al análisis de compuestos puramente orgánicos mediante el empleo de una reacción química (combustión u oxidación) de manera que todos los analitos y el trazador enriquecido son convertidos a una misma especie química (CO_2). De esta forma se garantiza una respuesta independiente del compuesto sin importar la fuente de ionización utilizada.

A continuación se resumen las principales conclusiones concretas que se derivan del trabajo realizado:

1.-Se ha modificado un instrumento GC-MS comercial que ha permitido realizar por primera vez, análisis por dilución isotópica en línea para la determinación de compuestos orgánicos a partir de su contenido en carbono. Se ha demostrado, para compuestos volátiles y estables térmicamente, que la respuesta instrumental es independiente de la especie y se han cuantificado con aceptable exactitud y precisión diferentes familias de compuestos orgánicos volátiles sin la necesidad de utilizar patrones específicos de calibración. Las modificaciones realizadas pueden instalarse de manera sencilla y con un coste relativamente bajo en cualquier instrumento GC-MS y además, no alteran el funcionamiento normal del equipo, manteniendo sus excelentes características en cuanto a sensibilidad y capacidad de identificación de compuestos.

2.-La información cuantitativa se obtiene de forma inmediata mediante la integración del cromatograma de flujo másico sin necesidad de construir rectas de calibración con patrones específicos. Por tanto el método desarrollado constituye una herramienta muy útil para el estudio cuantitativo y la optimización de etapas de preparación de muestra tal y como se ha demostrado para el caso concreto de la microextracción en fase sólida.

3.-Se ha evaluado el concepto de la dilución isotópica en línea de carbono para la detección y cuantificación de carbono inorgánico disuelto en agua (DIC) con buena exactitud y precisión, utilizando una membrana permeable para la extracción del CO_2 natural y enriquecido de la fase acuosa.

4.-Se ha evaluado y optimizado la reacción de oxidación de persulfato sódico en medio ácido para la oxidación cuantitativa a CO_2 de compuestos orgánicos puros

solubles en agua, demostrándose que para ciertas estructuras moleculares, se requieren condiciones más drásticas para conseguir una oxidación completa. Se cuantificaron con buena exactitud y precisión diferentes compuestos orgánicos solubles en agua (aminoácidos, azúcares y otras biomoléculas) utilizando un único patrón primario, ftalato ácido de potasio, con lo que los resultados obtenidos son directamente trazables al Sistema Internacional de unidades. De hecho, la metodología desarrollada se validó como método directo para la determinación de la pureza de sustancias orgánicas polares y de bajo peso molecular mediante la participación en el ejercicio de intercomparación CCQM-P117.c.

5.-Se ha demostrado que la dilución isotópica en línea empleando carbono-13 como trazador, se puede aplicar a la determinación de la pureza de péptidos sintéticos, para su posterior uso como estándares. A pesar de la imposibilidad de utilizar modificadores orgánicos, es posible obtener una buena resolución cromatográfica con fases móviles acuosas, empleando técnicas de intercambio iónico. Se ha propuesto un método alternativo, utilizando un LC preparativo para la purificación, para aquellos péptidos que no puedan eluirse adecuadamente en condiciones 100% acuosas. Ambos métodos se validaron mediante el análisis de distintos péptidos sintéticos, comparando los resultados con los obtenidos por otras técnicas establecidas, y de un material de referencia certificado.