

**Universidad de Oviedo**



**Programa de Doctorado  
“Química Física y Analítica”**

**Desarrollo de metodologías analíticas para  
la determinación de compuestos orgánicos  
halogenados contaminantes mediante  
dilución isotópica y espectrometría de  
masas**

**TESIS DOCTORAL**

**Lourdes Somoano Blanco**

**Oviedo, 2016**



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de compuestos orgánicos halogenados contaminantes mediante dilución isotópica y espectrometría de masas	Inglés: Development of analytical methodologies for the determination of halogenated organic compounds pollution by isotope dilution and mass spectrometry
2.- Autor	
Nombre: Lourdes Somoano Blanco	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Química-Física y Analítica	
Órgano responsable: Dpto. Química-Física y Analítica (Universidad de Oviedo)	

### RESUMEN (en español)

El principal objetivo de la Tesis que se presenta es el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de compuestos orgánicos como bifenilos policlorados (PCBs) y  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -hexabromociclododecano (HBCD) con el uso de la *dilución isotópica y la espectrometría de masas* (IDMS). El control analítico de este tipo de contaminantes es necesario, ya que se encuentran incluidos en el Convenio de Estocolmo. El desarrollo de metodologías analítica sencillas, rápidas y fiables para la determinación de contaminantes orgánicos halogenados es necesario en muestras sólidas de naturaleza medioambiental y biológica. La dilución isotópica se basa en la modificación de la composición isotópica del elemento o compuesto a determinar en la muestra, por la adición del elemento o compuesto enriquecido isotópicamente. De esta manera, los compuestos enriquecidos isotópicamente son necesarios para desarrollar las metodologías IDMS. IDMS proporciona resultados de una mayor calidad metrológica, en comparación con estrategias clásicas de calibración como pueden ser la calibración externa o las adiciones estándar.

Por este motivo, el primer paso en la determinación de los PCBs es la síntesis y caracterización de los doce PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ . El paso de la extracción con el uso de la técnica de microondas focalizadas permite disminuir el tiempo necesario en el proceso global de la determinación, en combinación con el uso de IDMS. Además, utilizando los PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  es posible emplear diferentes fuentes de ionización y analizadores de masas para la determinación de los PCBs mediante IDMS. Por lo tanto, otro de los objetivos de la presente Tesis es el uso de los compuestos enriquecidos isotópicamente para comparar diferentes instrumentos de espectrometría de masas. No solo los PCBs han sido determinados en este trabajo, también otro tipo de contaminantes orgánicos fueron estudiados, como son  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -hexabromociclododecano (HBCD). Estos contaminantes han sido incluidos también en el Convenio de Estocolmo, y se encuentran regulados desde 2013 por una legislación Europea para muestras de aguas superficiales continentales. La estrategia de cuantificación basada en metodologías IDMS, también utiliza análogos enriquecidos isotópicamente. En este caso, los diastereoisómeros del HBCD enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$  fueron utilizados para su determinación en muestras de agua por IDMS. El desarrollo de metodologías IDMS permite determinaciones exactas y precisas de los diastereoisómeros del HBCD a niveles por debajo de los requeridos por la Directiva Europea en muestras de agua reales.

Los compuestos halogenados (PCBs) y también los bifenil éteres bromados (PBDEs) han sido utilizados para desarrollar un método capaz de evaluar la exactitud espectral de los espectrómetros de masas, en instrumentos de cuadrupolo sencillo e instrumentos de triple cuadrupolo.



## RESUMEN (en Inglés)

The main aim of this Thesis is the development of analytical methodologies for the determination of organic compounds known as polychlorinated biphenyls (PCBs) and  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexabromocyclododecane (HBCD) using *isotope dilution mass spectrometry* (IDMS). The analytical control of this kind of pollutants it is necessary, because there are included in the Stockholm Convention. The development of simple, fast and reliable analytical methodologies for the determination of halogenated organic pollutants in biological and environmental solid samples is still needed. Isotope dilution is based on the modification of the isotope composition of the element or compound to be determined in the sample by the addition of an isotopically enriched or labelled form of the same element or compound. In this way, isotopically enriched compounds are required to develop these IDMS methodologies. IDMS provides results with higher metrological quality in comparison with more classical calibration strategies such as external calibration or standard additions.

For this purpose, the first step in the determination of PCBs is the synthesis and characterization of twelve PCBs enriched in  $^{37}\text{Cl}$ . The used of focused microwave technique in the extraction step allow to decrease time consumption in the global determination process, in combination with the use of IDMS. Besides, using  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCBs it is possible to employ different ionization sources and mass analyzers to determine PCBs by IDMS. So, another aim of this Thesis was the used of enriched compounds to compare different mass spectrometry instruments. Not only PCBs are determined in this work, also other kind of organic pollutants were studied, such as  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexabromocyclododecane (HBCD). These pollutants are also included in the Stockholm Convention, and also in 2013 the EU legislation regulated them for inland surface water samples. The quantification strategy based on IDMS methodology is also the use of enriched or labelled analogues. In this case, HBCD enriched in  $^{81}\text{Br}$  diastereoisomers are used to their determination in water samples by IDMS. The developed IDMS methodology allows accurate and precise determination of HBCD diastereoisomers at lower levels than those required by the European Directive in real water samples.

Halogenated compounds (PCBs), and also polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) were used to develop a method able to evaluate the spectral accuracy of mass spectrometers, in single quadrupole and triple quadrupole instruments.

SR. DIRECTOR DE DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA Y ANALÍTICA/  
SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA-FÍSICA Y  
ANALÍTICA \_\_\_\_\_



## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs)**

1.1.1 Estructura química.....	1
1.1.2 Propiedades físico-químicas.....	4
1.1.3 Aplicaciones y problemática medioambiental de los PCBs.....	5
1.1.4 Vías de exposición a los PCBs.....	7
1.1.5 Toxicología.....	8
1.1.6 Normativas para el control y eliminación de los PCBs.....	9

### **1.2 HEXABROMOCICLODODECANO (HBCD o HBCDD)**

1.2.1 Estructura química.....	10
1.2.2 Propiedades físico-químicas.....	13
1.2.3 Aplicaciones del HBCD y su problemática medioambiental.....	13
1.2.4 Toxicología.....	14
1.2.5 Normativas para el control del HBCD .....	14

### **1.3 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS HALOGENADOS**

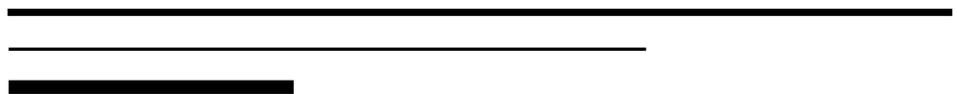
1.3.1 Técnicas de extracción de contaminantes orgánicos halogenados en muestras sólidas.....	16
1.3.1.1 Extracción Soxhlet.....	16
1.3.1.2 Extracción con líquidos presurizados.....	17
1.3.1.3 Extracción asistida por ultrasonidos.....	18
1.3.1.4 Extracción asistida por microondas.....	18
1.3.1.5 Extracción con microondas focalizadas.....	18
1.3.2 Técnica de extracción de contaminantes orgánicos halogenados en muestras líquidas .....	19
1.3.2.1 Extracción en fase sólida (SPE).....	19
1.3.2.2 Extracción líquido-líquido (LLE).....	20
1.3.3 Limpieza y preconcentración de los extractos.....	21
1.3.4 Técnicas de separación utilizadas en la determinación de contaminantes orgánicos halogenados en muestras reales.....	22
1.3.4.1 Cromatografía de Gases para la separación de PCBs.....	23
1.3.4.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para la separación de los isómeros del HBCD.....	24

	<b><u>Página</u></b>
1.3.5 Técnicas de detección de contaminantes orgánicos halogenados.....	25
1.3.5.1 La Espectrometría de Masas.....	26
1.3.5.1.1 Fuentes de ionización.....	26
1.3.5.1.2 Analizadores de masas.....	31
1.3.5.1.3 Detectores.....	35
<b>1.4 DILUCIÓN ISOTÓPICA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (IDMS)</b>	
1.4.1 El concepto de isótopo.....	36
1.4.2 Fundamentos teóricos del análisis por dilución isotópica.....	37
1.4.3 Medida de la composición isotópica de elementos y moléculas.....	39
1.4.4 La dilución isotópica en el análisis elemental.....	41
1.4.5 La dilución isotópica “en línea”.....	45
1.4.6 La dilución isotópica en el análisis de especiación elemental.....	47
1.4.6.1 La dilución isotópica inespecífica o “post-columna” en especiación elemental.....	47
1.4.6.2 La dilución isotópica específica en especiación elemental.....	48
1.4.7 La dilución isotópica en el análisis de compuestos orgánicos.....	50
1.4.7.1 Deconvolución de perfiles isotópicos para la cuantificación de compuestos orgánicos por IDMS.....	53
1.4.7.2 Efectos isotópicos y solapamiento espectral en dilución isotópica orgánica.....	55
1.4.7.3 Marcaje en el heteroátomo en análisis por dilución isotópica...	57
Introducción/Bibliografía.....	59
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>75</b>
<b>3. EXPERIMENTAL</b>	
3.1 Condiciones instrumentales.....	79
3.1.1 Condiciones para la purificación de los PCBs enriquecidos en <sup>37</sup> Cl mediante cromatografía de líquidos semipreparativa.....	79
3.1.2 Condiciones experimentales empleadas en la determinación de PCBs mediante GC-EI-MS/MS, GC-NCI-MS, GC-ICP-MS y GC-ICPMS/MS.....	79
3.1.3 Condiciones experimentales para la determinación de los diastereoisómeros α, β y γ del HBCD mediante LC-ESI-MS/MS...	82

	<u><b>Página</b></u>
3.1.4 Condiciones experimentales para la evaluación de la exactitud espectral Mediante GC-EI-MS y GC-EI-MS/MS.....	83
3.2 Procedimientos experimentales.....	85
3.2.1 Síntesis y purificación de los congéneres de PCBs enriquecidos isotópicamente en <sup>37</sup> Cl.....	85
3.2.1.1 Formación de Cl <sub>2(g)</sub> enriquecido en <sup>37</sup> Cl.....	85
3.2.1.2 Cloración del bifenilo.....	86
3.2.1.3 Purificación de los congéneres de PCBs enriquecidos isotópicamente.....	87
3.2.2 Procedimiento de extracción de PCBs en muestras sólidas mediante microondas focalizadas.....	87
3.2.3 Procedimiento de preparación de muestra para la determinación de los diastereoisómeros α, β y γ del Hexabromociclododecano (HBCD) en aguas mediante LC-ESI-MS/MS.....	88
3.3 Procedimientos matemáticos.....	89
3.3.1 Estudio del patrón de fragmentación de los PCBs en la fuente de Ionización electrónica (EI).....	89
3.3.2 Medida de la composición isotópica de Cl para la determinación de PCBs mediante IDMS utilizando equipos GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS, GC-NCI-MS.....	92
3.2.2.1 Corrección del efecto de la discriminación de masa.....	92
3.2.2.2 Corrección del efecto del tiempo muerto del detector.....	93
3.3.3 Determinación del enriquecimiento isotópico de los compuestos marcados utilizados.....	94
3.3.4 Determinación de compuestos orgánicos mediante IDMS utilizando regresión lineal múltiple.....	95
3.3.4.1 Cuantificación de PCBs mediante el uso de análogos enriquecidos en <sup>37</sup> Cl.....	95
3.3.4.2 Cuantificación de los diastereoisómeros del HBCD mediante el uso de análogos enriquecidos en <sup>81</sup> Br mediante LC-ESI-MS/MS.....	98
3.3.5 Determinación de PCBs mediante IDMS utilizando un calibrado metodológico.....	100
Experimental/Bibliografía.....	102

	<u>Página</u>
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1 Artículo científico 1.....	103
4.2 Artículo científico 2.....	137
4.3 Artículo científico 3.....	171
4.4 Artículo científico 4.....	197
<b>5. DISCUSIÓN INTEGRADORA.....</b>	<b>233</b>
Discusión integradora/Bibliografía.....	270
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>271</b>
<b>7. FACTOR DE IMPACTO.....</b>	<b>273</b>
<b>8. TRABAJO FUTURO.....</b>	<b>275</b>

# 1. Introducción





### 1. INTRODUCCIÓN.

Antes de comenzar describiendo los compuestos que se han estudiado a lo largo de la presente Tesis Doctoral es importante definir el concepto de contaminación. La palabra contaminación procede del latín *contaminatio* y hace referencia a la acción y efecto de contaminar. Este verbo, por su parte, se utiliza para denominar a la alteración nociva de la pureza o de las condiciones normales de un medio por agentes químicos o físicos. El uso más habitual del término se produce en el ámbito de la ecología con lo que se conoce como *contaminación ambiental*, que es la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico) en lugares, formas y concentraciones que pueden ser nocivos para la salud, la seguridad o para el bienestar de la población.

La contaminación es un problema global que se intenta atajar mediante la adopción de numerosas legislaciones y normativas que tienen como objetivo regular el nivel de los contaminantes en los distintos compartimentos medioambientales. De este modo, surge la necesidad de desarrollar metodologías analíticas fiables para la determinación de contaminantes ambientales en numerosos tipos de muestras como aguas sedimentos o materiales biológicos.

#### 1.1 BIFENILOS POLICLORADOS (PCBs)

##### 1.1.1 Estructura química

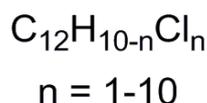
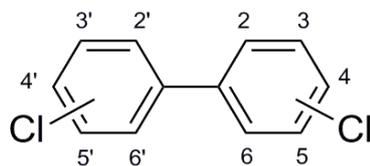
Los bifenilos policlorados (PCBs) son una serie de compuestos organoclorados que están formados por dos anillos aromáticos unidos entre sí por un enlace sencillo carbono-carbono en el que las distintas posiciones aromáticas de los anillos están ocupadas por un número variable de átomos de cloro. Al existir un total de diez posiciones posibles para los átomos de Cl, los PCBs pueden presentar hasta 209 congéneres distintos<sup>1,2</sup>. Para cada uno de los congéneres se asignan números del 1 al 209 según la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry).

En la Figura 1.1 puede observarse la estructura química y la fórmula empírica de los PCBs donde  $n$  puede variar entre 1 y 10. Si las posiciones 2, 2', 6 y 6' no tienen ningún cloro los bifenilos presentan una conformación coplanar, y se denominan PCBs *coplanares* o "*non-orto*". Si una de las posiciones orto de los anillos está sustituida se habla de PCBs *mono-orto* mientras que para el resto de posibilidades los PCBs son *no coplanares*.

## 1. Introducción

---

Si nos basamos en sus efectos toxicológicos, algunos congéneres se pueden clasificar como PCBs “*dioxin-like*” ya que poseen propiedades toxicológicas similares a las dioxinas<sup>3</sup>. Estos congéneres pueden ser coplanares “*non-orto*” (PCB-77, 81, 126 Y 169) o *mono-orto* (PCB-105, 114, 118, 123, 156, 157, 167 y 189).

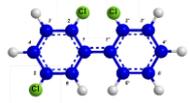
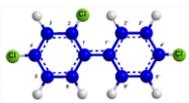
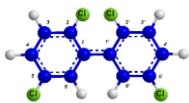
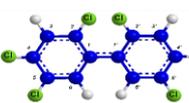
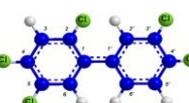
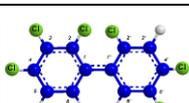
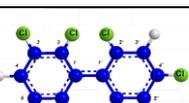


**Figura 1.1** Estructura química y fórmula empírica general de los PCBs.

En sus aplicaciones comerciales e industriales los PCBs siempre se utilizaron como mezclas de distintos congéneres. De esta forma, ciertos congéneres aparecen con más frecuencia que otros en el medioambiente. Algunas de las mezclas comerciales de los PCBs se conocen en los Estados Unidos por su nombre industrial registrado, como es el caso de Aroclor. Por ejemplo, Aroclor 1254 significa que la mezcla contiene aproximadamente 54% de cloro en peso.

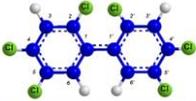
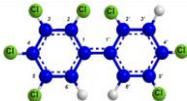
A lo largo de la presente Tesis Doctoral, se seleccionarán 12 congéneres para realizar el desarrollo de las metodologías analíticas ya que son los más demandados en laboratorios de rutina españoles y de la Unión Europea<sup>4,5</sup>. En la Tabla 1.1 puede observarse la nomenclatura, la estructura química y el número de átomos de Cl para cada uno de los doce congéneres en estudio. La selección de estos doce congéneres está basada en distintos criterios. Seis de ellos (PCB-28, 52, 101, 138, 153 y 180) son “*non-dioxin-like*” pero están considerados como indicadores por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)<sup>6,7</sup>. El PCB-118 está considerado como un PCB “*dioxin-like*” debido a su factor de equivalencia tóxica (TEF) asignado por la OMS (Organización Mundial de la Salud) respecto a la tetraclorodibenzodioxina de referencia 2,3,7,8-T4CDD<sup>8</sup>. Los otros cinco congéneres en estudio (PCB-18, 31, 44, 149 y 194), se incluyen en esta mezcla de interés debido a su presencia en el medio ambiente, como consecuencia de su aparición en mezclas comerciales utilizadas en numerosas aplicaciones industriales desde principios del siglo pasado.

**Tabla 1.1** Nomenclatura, estructura química y número de átomos de Cl de cada uno de los doce congéneres de PCBs en estudio.

Congéneres	Estructura química	Nº de átomos de Cl
PCB-18		3
PCB-28		3
PCB-31		3
PCB-44		4
PCB-52		4
PCB-101		5
PCB-118		5
PCB-138		6
PCB-149		6

## 1. Introducción

---

PCB-153		6
PCB-180		7
PCB-194		8

### 1.1.2 Propiedades físico-químicas

Las propiedades físico-químicas de los PCBs dependen en gran medida del número y de la posición de los átomos de Cl en la molécula. Por ejemplo, la volatilidad de las distintas moléculas varía según el grado de cloración. En general, los congéneres con un menor número de átomos de Cl son líquidos a temperatura ambiente, mientras que al aumentar el contenido en cloro se hacen más viscosos y menos volátiles. Por el contrario, otras propiedades, como por ejemplo, la solubilidad en agua y la presión de vapor, disminuyen a medida que aumenta el número de átomos de Cl en la molécula<sup>9,10</sup>.

Entre las características y/o propiedades físico-químicas de los PCBs podemos destacar:

- Densidad entre 1.2 y 1.6 g cm<sup>-3</sup> dependiendo del grado de cloración.
- Punto de ebullición entre 320 - 420°C.
- Baja presión de vapor (semivolátiles) entre 0.2 - 1.33x10<sup>-3</sup> Pa.
- Coeficiente de partición octanol-agua (Kow) de 6,30 (estimado), lo que se manifiesta en una tendencia a la bioacumulación.
- Alta solubilidad en aceites y disolventes orgánicos.
- Alta constante dieléctrica (baja conductividad eléctrica).
- Alta resistencia al fuego (pirorresistentes). Cuando se calientan pueden producir Dibenzofuranos policlorados entre los 550 - 700°C.

- Son estables a reacciones fotoquímicas.
- Resisten la oxidación debida a ácidos y bases.

Todas las propiedades descritas anteriormente, como por ejemplo su estabilidad térmica y baja reactividad explican por qué los PCBs se han utilizado en numerosas aplicaciones industriales. Sin embargo, esas mismas propiedades, hacen que persistan en el medioambiente y sigan constituyendo un problema medioambiental de gran actualidad aunque su uso y comercialización se haya prohibido desde hace años.

### 1.1.3 Aplicaciones y problemática medioambiental de los PCBs

La primera síntesis de PCBs fue realizada por Schmitt-Schulz en Alemania en 1881, iniciándose su producción a nivel industrial por la empresa Monsanto en 1929. La preocupación sobre la presencia de los PCBs en el medio ambiente comenzó hacia los años 60 del siglo pasado. Originalmente los aceites con PCBs se utilizaban como fluidos dieléctricos en transformadores, y condensadores debido a su baja inflamabilidad<sup>11,12</sup>. Sin embargo, su uso se extendió hasta tal punto que los PCBs están presentes en muchos otros productos como barnices, parafinas, resinas sintéticas, pinturas, recubrimientos, lubricantes, modificadores de aceite (adelgazadores), fluidos para intercambiadores de calor, fluidos hidráulicos, en lámparas fluorescentes, plaguicidas, agroquímicos, etc.

Los PCBs se caracterizan por su gran estabilidad en el medio ambiente, su alto potencial de bioacumulación y su resistencia a biodegradarse<sup>13,14,15,16</sup>. Además estos compuestos no tienen tendencia a disolverse en agua y tienden a evaporarse con facilidad. Debido a su gran estabilidad química y térmica, los PCBs eran compuestos de gran interés industrial. Sin embargo, esas mismas propiedades hicieron que años más tarde, los PCBs también se clasificaran como sustancias altamente tóxicas prohibiéndose en los años 80 del siglo pasado su comercialización en una gran parte de los países industrializados, como son Australia, China, Checoslovaquia, Francia, Alemania, Italia, Japón, Rusia, España, Reino Unido y Estados Unidos<sup>17</sup>.

El 22 de mayo de 2001 se celebró en Suecia el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes<sup>18,19</sup>. El objetivo de este acuerdo firmado por un total de 151 países fue adoptar un tratado internacional destinado a restringir y eliminar la producción, utilización, emisión y almacenamiento de doce compuestos

## 1. Introducción

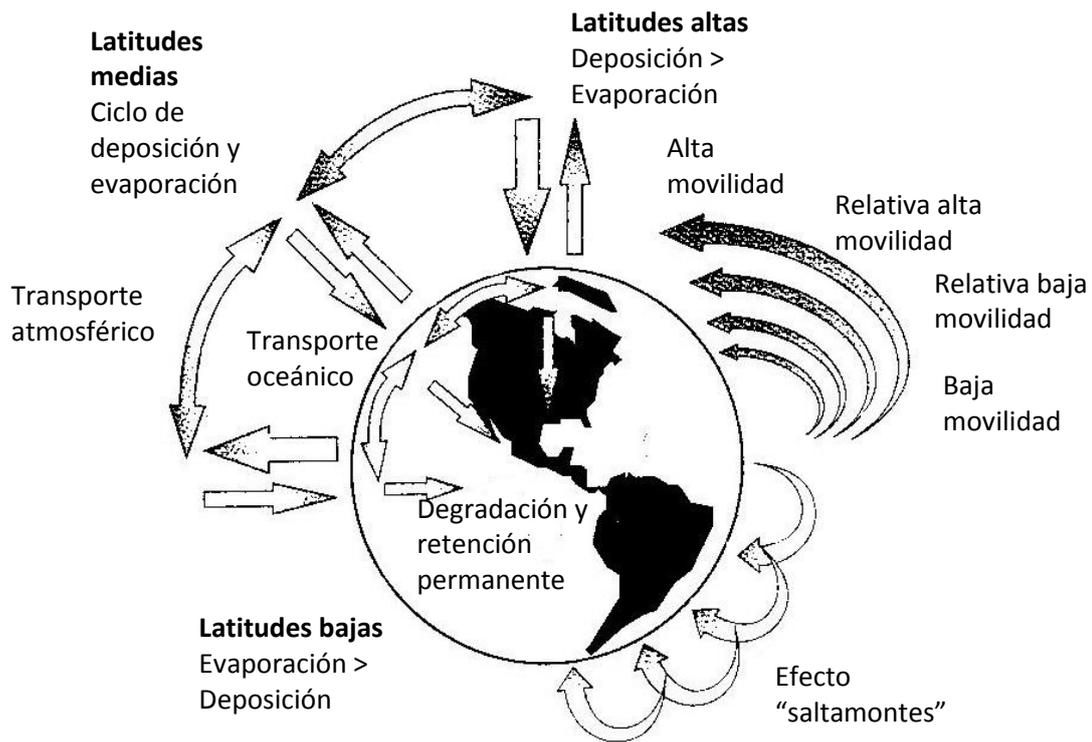
---

contaminantes nombrados por el Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Estos doce contaminantes orgánicos persistentes (COPs) son: ocho plaguicidas (aldrin, clordano, DDT, dieldrin, endrin, heptacloro, mirex y toxafeno), dos productos químicos industriales (hexaclorobenceno y PCBs), y dos familias de subproductos químicos (las dioxinas policloradas y los furanos).

Todos estos compuestos tienen una serie de características comunes:

- Son altamente tóxicos.
- Persisten en el medioambiente durante años incluso décadas antes de degradarse en compuestos menos tóxicos.
- Se evaporan con cierta facilidad por lo que pueden desplazarse a lo largo de grandes distancias a través del aire y el agua.
- Se acumulan en el tejido adiposo.

Debido a su persistencia y movilidad, los COPs se encuentran literalmente en todas las partes del mundo, incluso en el Ártico, la Antártida y las islas remotas del Pacífico<sup>20,21,22,23,24</sup>. El transporte de los COPs depende de la temperatura y está basado en un proceso conocido como “efecto saltamontes”. En este proceso los contaminantes químicos se transportan mediante “saltos” a lo largo del planeta de modo que se evaporan en los lugares cálidos, son transportados a largas distancias por el viento y las partículas de polvo, y se condensan en lugares más templados. Mediante procesos secuenciales de evaporación y condensación se produce un desplazamiento general de los contaminantes hacia los polos y las zonas montañosas<sup>25,26</sup>. En la Figura 1.2 se puede observar de forma esquemática el proceso de transporte y fraccionamiento que siguen los COPs.



*Figura 1.2 Procesos de transporte y fraccionamiento latitudinal de los COPs (imagen adaptada de referencia<sup>25</sup>).*

### 1.1.4 Vías de exposición a los PCBs

La exposición de los seres humanos a los PCBs puede darse por varias vías:

- Mediante la utilización de equipos electrónicos fabricados hace más de treinta años. Estos objetos pueden liberar en lugares cerrados pequeñas cantidades de PCBs al aire cuando se calientan durante su funcionamiento. Además, debido al envejecimiento de los objetos se pueden producir escapes, pudiendo constituir también una fuente de exposición para la piel.
- Mediante el consumo de alimentos contaminados. Las principales fuentes de PCBs en la dieta son pescados (especialmente aquellos cogidos en lagos, ríos, arroyos o lagunas contaminadas), carnes y productos lácteos.
- En un entorno laboral durante la reparación o mantenimiento de transformadores con PCBs o accidentes, incendios y escapes de transformadores, luces fluorescentes y otros artefactos eléctricos antiguos; y por el contacto con desechos de materiales con PCBs.

## 1. Introducción

---

- Una mala gestión de residuos contaminados con PCBs.

En relación a este último punto cabe destacar un desgraciado accidente ocurrido en el año 1999 en Bélgica, cuando el aceite de un transformador viejo con PCBs y dioxinas (compuestos halogenados aromáticos que se forman durante la combustión de diversas sustancias orgánicas) fueron a parar a un contenedor en el que se reciclaba aceite de freír usado. Este aceite reciclado se utilizó como aditivo en alimentos para animales, de forma que 60 litros de PCBs y/o dioxinas se introdujeron en la cadena alimentaria. Dos meses más tarde se declararon 300.000 toneladas de alimentos, 100.000 toneladas de carne y varios millones de pollos como no aptos para el consumo. A este accidente se le denominó “*la crisis de las dioxinas*”<sup>27</sup>, y con él quedó patente que la eliminación gradual, la prohibición, el almacenamiento controlado y la eliminación final segura de los COPs debe seguir siendo una prioridad máxima para la comunidad internacional.

### 1.1.5 Toxicología

Los efectos adversos que los PCBs ejercen sobre el medio ambiente y sobre los seres vivos que en él habitan han sido demostrados, a través de multitud de estudios<sup>28,29</sup>. En las plantas, los efectos se refieren principalmente a una disminución de la velocidad de la división celular y de la fijación de CO<sub>2</sub> en algas, además de una inhibición del crecimiento. En los animales, algunos PCBs tienen efectos cancerígenos, teratógenicos (malformaciones en el embrión o feto) e inmunodepresivos. Como se ha comentado en la sección anterior, los humanos se exponen a los PCBs a través de diversas vías, principalmente por vía respiratoria y vía digestiva particularmente mediante el consumo de pescado. Debido a su naturaleza lipofílica, los PCBs se acumulan en los tejidos ricos en lípidos como pueden ser el tejido adiposo, el cerebro, hígado, etc. Estos compuestos son capaces de atravesar la placenta y ser expulsados a través de la leche materna<sup>30,31,32</sup>.

Los PCBs pueden causar cáncer en el hígado, el pulmón y la piel, y también se han asociado al cáncer de pecho<sup>33</sup>. Existen estudios que relacionan los PCBs con tumores cerebrales y melanoma en trabajadores expuestos a estas sustancias. Otros estudios evidencian cómo los PCBs pueden actuar como hormonas naturales del organismo (por ejemplo estrógenos), actuando como disruptores hormonales<sup>34</sup> que producen infertilidad, y otros desórdenes relacionados con las hormonas.

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer, que es parte de la OMS, mide el riesgo carcinogénico de las sustancias químicas y las clasifica en dos grupos: las que son “carcinógenos humanos” (grupo 1) y las que son “probables carcinógenos humanos” (grupo 2). Asimismo el último grupo se subdivide en grupos A y B. Para el grupo 2 A, la evidencia de carcinogenicidad es “bastante sólida” y para el grupo 2 B, la evidencia es “menos sólida”. Según esta clasificación los PCBs pertenecen al grupo 2 B. Entre otros efectos se encuentran lesiones cutáneas (cloracné), efectos estrogénicos, reducción de la respuesta inmunológica, reducción de la capacidad pulmonar, inflamación y ardor de ojos, lesiones hepáticas, espasmos musculares, dolores abdominales, debilidad, náuseas, dolor de cabeza, impotencia e insomnio.

### 1.1.6 Normativas para el control y eliminación de los PCBs

Existen multitud de normativas a nivel mundial para el control y la eliminación de los PCBs. Como se comentó anteriormente, con la creación en 1972 del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) se incluyeron a los PCBs dentro de las doce sustancias orgánicas más contaminantes, susceptibles de bioacumulación y persistencia en el medio ambiente. En 1976 la Directiva del Consejo 76/464/CEE relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático incluyó también a los PCBs como sustancias peligrosas debido a su capacidad de persistencia en el medio ambiente.

Por otra parte, el Convenio de Basilea es un tratado internacional firmado el 22 de marzo de 1989 con el objetivo de proteger el medio ambiente y la salud humana de los efectos nefastos derivados de la producción, los movimientos transnacionales y la gestión de residuos peligrosos. En el marco de este Convenio, se han elaborado y difundido Directivas Técnicas sobre Gestión Ecológicamente Racional (GER) de residuos con COPs, sobre todo PCBs, con vistas a minimizar la generación de estos residuos y controlar su almacenamiento, transporte, tratamiento, reutilización, reciclaje, valoración y su eliminación final. Por ello, en el Artículo VIII del Convenio de Basilea se establece que todos los residuos que contengan más de  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  de PCBs, y otros COPs se deben considerar residuos peligrosos, y por ello, deben ser destruidos en instalaciones habilitadas y autorizadas a dicho efecto.

En 16 de septiembre de 1996 se establece la Directiva 96/59/CE del Consejo relativa a la eliminación de los PCBs y de los policloroterfenilos (PCT). La citada Directiva tiene

## **1. Introducción**

---

por objeto la aproximación de las legislaciones de los estados miembros sobre la eliminación controlada de los PCBs, la descontaminación o eliminación de aparatos que contengan PCB y la eliminación de PCB usados a fin de eliminarlos completamente.

El Convenio de Estocolmo firmado en mayo de 2001 establece un marco basado en el principio de prevención encaminado a garantizar la eliminación, en condiciones de seguridad, así como la disminución de la producción y de la utilización de estas sustancias nocivas para la salud humana y para el medio ambiente. El protocolo entró en vigor el 23 de octubre de 2003, limitando de manera especialmente estricta el uso de PCBs y estableciendo su eliminación. Según el programa PNUMA, un contenido superior a 50 partes por millón (ppm) constituye el umbral a partir del cual un producto debe ser considerado contaminado. Con arreglo a las disposiciones de este Convenio, los Estados deberán prohibir, o al menos aprobar, las medidas legislativas y administrativas necesarias para detener la producción y el uso de los PCBs. Según este convenio la producción de PCBs está totalmente prohibida en todos los países que forman parte del mismo. Los equipos que contengan PCBs deberán ser inventariados, etiquetados y retirados antes de 2025 y correctamente almacenados, para luego ser eliminados de manera ecológicamente racional antes de 2028.

En España, según el Real Decreto 9/2005 se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo, y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. Este Real Decreto presenta un listado de contaminantes y niveles genéricos de referencia para la protección de la salud humana, en función del uso del suelo. Los valores para los distintos tipos de suelos establecidos para los PCBs son:

- Uso industrial 0,8 mg Kg<sup>-1</sup> peso seco.
- Uso urbano 0,08 mg Kg<sup>-1</sup> peso seco.
- Otros usos 0,01 mg Kg<sup>-1</sup> peso seco (límite inferior de detección).

### **1.2 HEXABROMOCICLODODECANO (HBCD o HBCDD)**

#### **1.2.1 Estructura química**

Los retardantes de llama (también llamados ignífugos) son compuestos o mezclas de compuestos químicos incorporados a plásticos, textiles o circuitos electrónicos para

reducir la inflamabilidad de un material o para demorar la propagación de las llamas a lo largo y a través de su superficie. Durante el proceso de combustión se producen radicales libres, los cuales son capturados por los halógenos presentes en la estructura química de los retardantes de llama, ralentizando la propagación de las llamas. Sin embargo, no todos los compuestos orgánicos halogenados son adecuados para ser utilizados como retardantes de llama<sup>35</sup>. Los retardantes de llama se han considerado durante mucho tiempo como altamente beneficiosos ya que al reducir la inflamabilidad de muchos productos, han disminuido la tasa de incendios y accidentes menores, y en los casos inevitables de siniestro, actúan reduciendo su agresividad, su velocidad de propagación, y la producción de humos y gases de combustión, minimizando así la pérdida de vidas y los costes económicos derivados de los incendios. Existen más de 175 tipos de retardantes de llama, generalmente divididos en compuestos orgánicos halogenados (normalmente compuestos bromados o clorados), compuestos que contienen fósforo, compuestos que contienen nitrógeno y compuestos inorgánicos retardantes de llama.

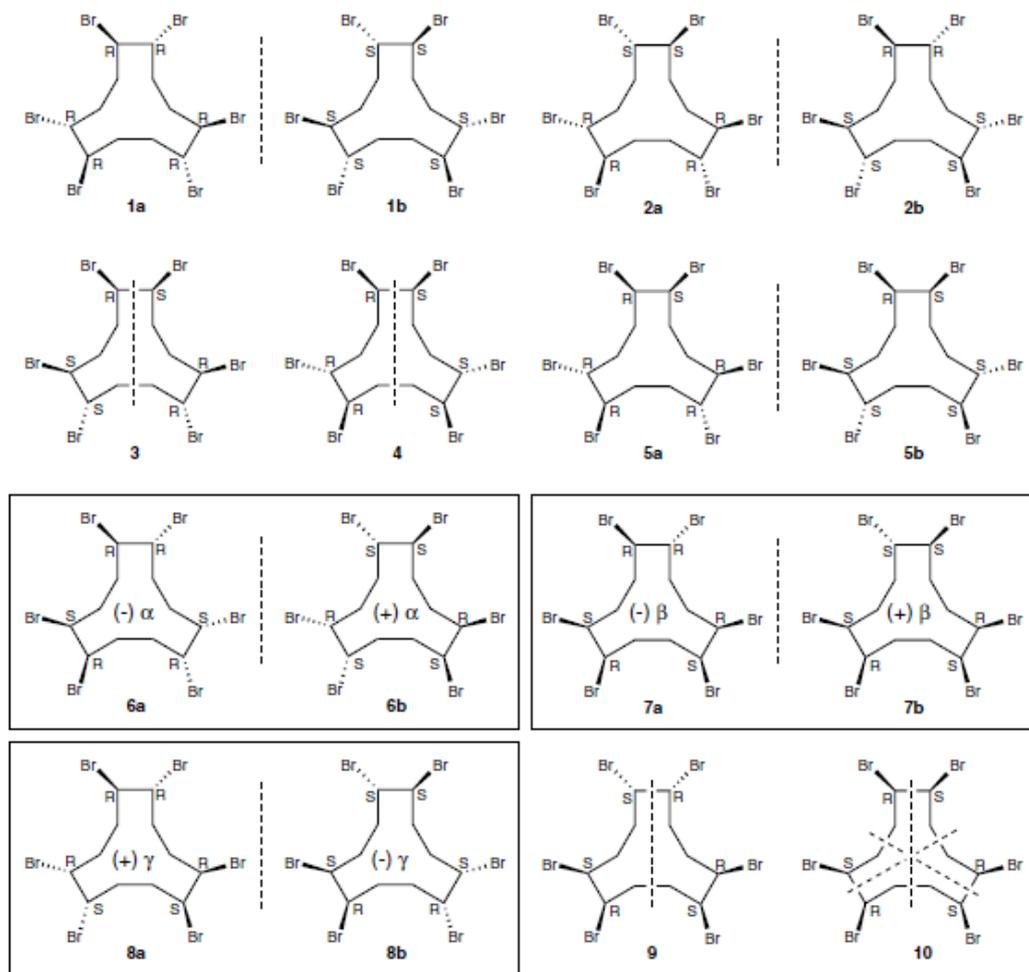
Los retardantes de llama bromados también llamados BFRs (Brominated Flame Retardants) son actualmente el grupo más grande del mercado debido a su bajo costo y alta eficiencia; de hecho existen más de 75 BFRs disponibles comercialmente<sup>36</sup>. Algunos de los principales retardantes de llama contienen compuestos orgánicos bromados como los bifenilos polibromados (PBBs), los éteres bifenílicos polibromados (PBDEs), el tetrabromobisfenol A (TBBPA) y el hexabromociclododecano (HBCD).

De entre todos los posibles retardantes de llama existentes, la presente Tesis Doctoral se centra en los diastereoisómeros del hexabromociclododecano (HBCD). En los últimos años el uso de HBCD ha aumentado considerablemente, ya que ha remplazado a otras formulaciones de retardantes de llama como los PBDEs que ya han sido prohibidos en Europa<sup>37</sup>. Su fórmula molecular es  $C_{12}H_{18}Br_6$ , se trata de un ciclo no aromático de alcano bromado que presenta distintas conformaciones espaciales dando lugar a los distintos isómeros.

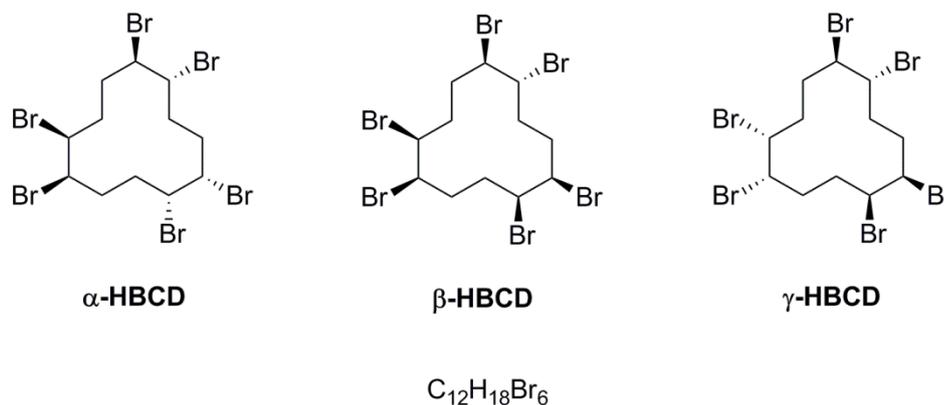
Industrialmente se produce mediante la adición de bromo al *cis-trans-trans*-1,5,6-ciclododecatrino<sup>38</sup>. Teóricamente, este proceso de síntesis puede dar lugar a la obtención de una mezcla de 16 estereoisómeros, seis pares de enantiómeros y cuatro formas meso. En la Figura 1.3 se puede observar la estructura química de los 16

## 1. Introducción

estereoisómeros del HBCD. Normalmente las mezclas técnicas comercializadas suelen contener una mezcla de tres isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Aunque estos tres isómeros son los mayoritarios, también se han encontrado los isómeros  $\delta$ - y  $\epsilon$ -HBCD en proporciones inferiores al 0.5%<sup>39,40</sup>. En la Figura 1.4 se puede observar la estructura química de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD, los cuales son objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral.



**Figura 1.3** Estructura química de los 16 estereoisómeros del HBCD: seis pares de enantiómeros ((1a, 1b), (2a, 2b), (5a, 5b), (6a, 6b), (7a, 7b), (8a, 8b)) y cuatro formas meso (3, 4, 9, 10).



*Figura 1.4 Estructura química de los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD.*

### 1.2.2 Propiedades físico-químicas

Se debe tener en cuenta que las diferencias estructurales de los estereoisómeros individuales de HBCD pueden ser las responsables de sus diferentes propiedades como su polaridad y su solubilidad en agua o en medios lipofílicos. Por ejemplo, la solubilidad en agua del  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HBCD es 48,8; 14,7 y 2,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente<sup>41</sup>. Estas diferencias podrían ser las responsables de las desiguales velocidades de absorción biológica y metabólica que presentan estos tres diastereoisómeros del HBCD en el medio ambiente. Las propiedades físico-químicas del HBCD son similares a las de otros compuestos orgánicos persistentes como los PCBs (mencionadas anteriormente). Por ejemplo, el HBCD al igual que los PCBs, tiene un alto coeficiente de partición octanol/agua (5,6) por lo que es un compuesto potencialmente bioacumulable.

### 1.2.3 Aplicaciones del HBCD y su problemática medioambiental

El HBCD está en el mercado mundial desde finales de los años 60. Los principales productores son China, Estados Unidos, Europa y Japón. Se utiliza principalmente como agente retardante de llama en espumas de poliestireno, textiles y equipamiento electrónico doméstico. Sus aplicaciones son múltiples en productos finales como tapizados, muebles, textiles de interior, interior de automóviles, cojines, materiales de embalaje o materiales de construcción como recubrimientos de paredes<sup>42</sup>. En consecuencia, el HBCD se encuentra distribuido ampliamente en locales y edificios públicos. De igual forma, se encuentran presentes en el hogar en productos como alfombras, telas para tapicería y cortinas, recubrimientos, elementos de construcción, muebles de procedencia industrial y electrodomésticos.

## 1. Introducción

---

El HBCD se puede liberar a la atmósfera, el agua, la tierra y los sedimentos durante todas las etapas de la vida útil del material en el que esté presente como la producción, fabricación, procesamiento, transporte, uso, manejo y almacenamiento. El HBCD es persistente en la atmósfera y se transporta a largas distancias. Se ha observado su presencia generalizada en regiones remotas como el Ártico, donde las concentraciones en la atmósfera y en los principales predadores son elevadas<sup>43,44,45</sup>. Debido a la naturaleza lipofílica y potencialmente bioacumulable<sup>46</sup> de los isómeros del HBCD, estos han sido detectados en distintas matrices ambientales además de en animales acuáticos y/o terrestres<sup>47,48,49</sup>. Según estudios realizados dependiendo del tipo de matriz aparecen de forma mayoritaria unos isómeros u otros, por ejemplo, en los sedimentos el  $\gamma$ -HBCD es el isómero más abundante, mientras que en biota el isómero predominante es  $\alpha$ -HBCD<sup>50,51</sup>.

### 1.2.4 Toxicología

El uso del HBCD es reciente en comparación con otros compuestos como los PCBs. Por tanto, muchas de sus propiedades toxicológicas se encuentran todavía en estudio. Según algunos de los estudios realizados<sup>52</sup>, el HBCD se absorbe a través del tracto gastrointestinal, lo que explicaría como la ingesta es la fuente más habitual de exposición humana, y se acumula en el tejido adiposo, el músculo y el hígado en animales de laboratorio. Por ejemplo, la exposición repetida a HBCD en ratas mostró alteraciones en el sistema hormonal tiroideo<sup>53,54,55</sup>.

Hasta la fecha, el conocimiento de los mecanismos subyacentes a la toxicidad inducida del HBCD es escaso. Estructuralmente el HBCD es diferente a otros compuestos orgánicos halogenados como los PCBs y PBDEs, y diferente a la estructura de hormonas tiroideas. Por esta razón es de esperar que el HBCD tenga un menor potencial para alterar a las enzimas de biotransformación y al eje tiroideo. Sin embargo, recientes estudios sugieren que al igual que algunos PCBs, el HBCD tiene un alto potencial de bioacumulación y en organismos expuestos podría afectar la biotransformación enzimática y la homeostasis tiroidea<sup>56,57,58</sup>.

### 1.2.5 Normativas para el control del HBCD

El HBCD fue propuesto como posible contaminante orgánico persistente (COP) por Noruega en el Convenio de Estocolmo de 2008. En 2010, el Comité de Examen de los

Contaminantes Orgánicos Persistentes decidió, en su sexta reunión, que era probable que el HBCD, como resultado de su transporte ambiental de largo alcance, pudiera tener efectos adversos importantes para la salud humana y el medio ambiente, de modo que se justificaba la adopción de medidas a nivel mundial. En 2014 fue añadido a la lista de COPs según este convenio.

En junio de 2007 entró en vigor el Reglamento (CE) nº 1907/2006 para el registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), derogando la Directiva 76/796/EEC. Esta regulación, gestionada por la Agencia Europea de Productos Químicos (ECHA) se ocupa de la identificación, etiquetado y gestión, de la puesta en el mercado y uso de productos químicos, destinada a regular o prohibir ciertas sustancias y usos que presenten un riesgo inaceptable para la salud. En el artículo (57) del mencionado Reglamento, el HBCD ha sido identificado como sustancia persistente, bioacumulable y tóxico. En octubre de 2008, el HBCD fue incorporado a la lista “SVHC” (substance of very high concern) por ECHA de acuerdo al Reglamento 1907/2006 REACH, este es el primer paso del procedimiento para la restricción del uso de una sustancia química. El HBCD, en febrero de 2011, se enumera en el anexo XIV del REACH, restringiéndose su uso hasta la llamada “cláusula de extinción” (21 de agosto de 2015), tras esta fecha únicamente ciertas aplicaciones autorizadas serán permitidas por la EU.

En octubre de 2000 se establece la Directiva 2000/60/CE por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, conocida como Directiva Marco del Agua (DMA). Esta Directiva nace como respuesta a la necesidad de unificar las actuaciones en materia de agua en la Unión Europea. El HBCD se incluye en la directiva Europea 2013/39/EU por la que se modifican las Directivas 2000/60/EC y 2008/105/CE para sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Según esta Directiva se establecen unos valores para una serie de compuestos, entre ellos el HBCD en distintos tipos de aguas (superficiales, subterráneas, etc). Estos valores mínimos que marca la legislación serán los valores de referencia a la hora de desarrollar, en la presente Tesis Doctoral, la metodología analítica para la determinación de los mismos en matrices acuosas.

### 1.3 MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS HALOGENADOS

A la hora de desarrollar un método analítico para la determinación de contaminantes orgánicos halogenados en muestras reales, la etapa de la preparación de muestra es, sin duda, el paso más crítico<sup>59</sup>. La finalidad de esta etapa es separar de la matriz los compuestos en estudio de la manera más eficiente posible. Para ello, a parte de la aplicación de un proceso de extracción pueden ser necesarias diversas etapas de limpieza, con el fin de eliminar posibles compuestos interferentes que pueden, no solo dificultar la cuantificación, sino también dañar el equipo de medida. Además, es necesaria la aplicación de etapas de preconcentración cuando los niveles de concentración en los que se encuentran los analitos son muy bajos. El número y el tipo de etapas de preparación de muestra, previas a la detección de los analitos, dependerá tanto del tipo de muestra (si es una muestra sólida, líquida o gaseosa), como de las propiedades físico-químicas de los analitos (volatilidad, polaridad, solubilidad, etc).

Los compuestos en estudio en la presente Tesis Doctoral son, como se ha mencionado al comienzo de esta introducción, contaminantes orgánicos halogenados<sup>60, 61</sup>. Estos compuestos presentan una baja solubilidad en agua, una gran tendencia a acumularse en los tejidos grasos de los seres vivos (bioacumulación), y son capaces de biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica. Por todo ello, estos compuestos tienen tendencia a encontrarse en matrices complejas sólidas, como sedimentos y tejidos biológicos.

#### 1.3.1 Técnicas de extracción de contaminantes orgánicos halogenados en muestras sólidas

##### 1.3.1.1 Extracción Soxhlet

Esta técnica de extracción es de las más utilizadas para la extracción de COPs en muestras sólidas<sup>62,63</sup>, concretamente en el caso de los PCBs se pueden citar algunos ejemplos donde es la extracción Soxhlet ha sido utilizada en matrices como suelos o tejidos de pescado<sup>64,65,66</sup>. Consiste en introducir la muestra en un dedal poroso, sobre el que se hace pasar de forma continua un disolvente orgánico o una mezcla de disolventes orgánicos a reflujo de una manera cíclica. Tras los sucesivos ciclos, el disolvente se va “enriqueciendo” en el analito extraído. Entre las ventajas que presenta esta técnica de

extracción se encuentra la capacidad de utilizar gran cantidad de muestra (desde 1g hasta 100 g) y que no es necesario llevar a cabo un filtrado del disolvente de extracción una vez finalizado el proceso. Además, se pueden disponer varios sistemas Soxhlet para trabajar de forma simultánea. A pesar de ser una de las técnicas de extracción más utilizadas, presenta una serie de inconvenientes como el tiempo necesario para llevar a cabo la extracción, con ciclos de más de 24 h en algunos casos y la necesidad de utilizar grandes volúmenes de disolvente orgánico para llevar a cabo los ciclos de extracción (más de 250 mL). Esto implica que, tras la etapa de extracción, haya que realizar una tediosa etapa de preconcentración de los extractos que incrementa el tiempo del análisis. Otras desventajas residen en la manipulación y limpieza de gran cantidad de material vidrio.

### 1.3.1.2 Extracción con líquidos presurizados

La extracción con líquidos presurizados es otra de las técnicas utilizadas para la extracción de contaminantes orgánicos<sup>67,68</sup>. En el caso de los PCBs existen ejemplos en la literatura, en los que esta técnica se aplica, tanto a muestras medioambientales como materiales biológicos<sup>69,70</sup>.

El fundamento de esta técnica de extracción es similar al Soxhlet, pero en este caso los disolventes se encuentran a elevadas presiones (10-15 MPa) y a temperaturas entre 50-200 °C. Además el proceso de extracción se realiza en periodos cortos de tiempo (entre 5-10 min) utilizando mucho menos volumen de disolvente (aproximadamente 40 mL) con respecto al Soxhlet. Esta técnica proporciona altos rendimientos de extracción debido a la combinación de altas temperaturas y presiones. Por tanto, las principales ventajas que proporciona esta técnica con respecto al Soxhlet es la reducción en el volumen de disolvente y en el tiempo del análisis. Además, en algunos casos es posible llevar a cabo los procesos de extracción y limpieza de los extractos en una sola etapa. El mayor inconveniente de esta técnica es el alto coste de la instrumentación y que las condiciones y parámetros de extracción deben ser previamente optimizados (disolvente de extracción, presión, tiempo de calentamiento, volumen de carga, etc). Además, hay que tener en cuenta la posible contaminación cruzada si no se limpia adecuadamente la celda de extracción. En los últimos años se ha desarrollado una técnica llamada extracción selectiva con líquidos presurizados<sup>71,72</sup>, que combina la utilización de

## **1. Introducción**

---

líquidos presurizados para realizar la extracción con la adición de adsorbentes que facilitan la eliminación de interferentes de la matriz.

### **1.3.1.3 Extracción asistida por ultrasonidos**

Esta sencilla técnica de extracción utiliza sonidos de alta frecuencia (ultrasonidos) para facilitar el paso de los analitos desde el sólido al extractante. La presión y la temperatura aumentan debido a la acción de las ondas de alta frecuencia facilitando la extracción de los analitos. Según algunos estudios, el rendimiento de extracción de esta técnica es comparable a otras técnicas más clásicas. Presenta la ventaja de una instrumentación sencilla que puede consistir en una sonda o un baño de ultrasonidos<sup>73,74</sup>.

### **1.3.1.4 Extracción asistida por microondas**

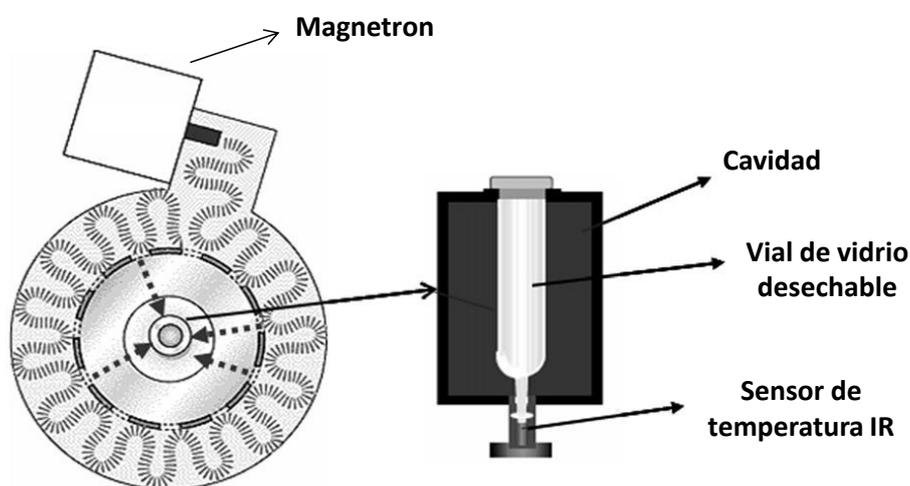
Esta técnica de extracción proporciona elevados rendimientos de extracción en un periodo corto de tiempo. En el proceso de calentamiento, la energía se transfiere en dos mecanismos, la rotación de los dipolos de las moléculas debido a la interacción con las ondas microondas y la conducción iónica debida a la rotación de los dipolos y desplazamientos de los iones cargados, presentes en el soluto y en el disolvente<sup>75</sup>. Al tratarse de una técnica automatizada permite el control de la temperatura, presión y energía de microondas proporcionada. Las ventajas que presenta esta técnica son varias: i) como la reducción en la cantidad de disolvente de extracción en comparación con otras técnicas como el Soxhlet, ii) menores tiempos de extracción, iii) control exhaustivo de la temperatura, presión y energía suministrada durante la extracción, iv) capacidad de llevar varias extracciones de forma simultánea (automatización). Como desventajas, podemos destacar la necesidad de optimizar previamente las condiciones de extracción, implementar métodos de limpieza cuando la extracción no se lleva a cabo en recipientes desechables y el coste económico que supone la adquisición de este tipo de instrumentación<sup>76,77</sup>.

### **1.3.1.5 Extracción con microondas focalizadas**

En la presente Tesis Doctoral la técnica de extracción utilizada ha sido la extracción con microondas focalizadas. El principio fundamental se basa en la utilización de las ondas microondas como mecanismo de extracción, pero con algunas peculiaridades instrumentales<sup>78,79</sup>. Se pueden citar algunos ejemplos para la extracción de compuestos

organometálicos<sup>80</sup> y elementos como el Cr<sup>81</sup> en matrices sólidas de importancia medioambiental.

Este tipo de instrumentación de microondas permite además de minimizar el tiempo de análisis, la posibilidad de generar calor desde el interior de la muestra de forma homogénea, en contraste con el calentamiento en convección donde el calor se transfiere de forma heterogénea desde la fuente a las paredes de los recipientes de la muestra. Como puede observarse en la Figura 1.5, este tipo de sistemas microondas incorporan una cavidad circular y una “guía de onda”, capaz de auto-sintonizar la radiación, enfocarla y dirigirla hacia el recipiente de muestra. Este sistema consta de varios puntos de entrada de la radiación compensando las variaciones en las características y tamaño de las muestras. Estos sistemas de microondas focalizados permiten un mejor control de la aplicación de la energía microondas a la muestra y un mayor control de la presión y la temperatura a la que se lleva a cabo la extracción en comparación con microondas convencionales. Además, el sistema permite realizar una agitación magnética de la muestra y varias extracciones mediante el empleo de muestreadores automáticos.



*Figura 1.5 Esquema de un equipo de microondas focalizadas Modelo Discover de la empresa CEM Corporation (imagen adaptada referencia<sup>80</sup>).*

### 1.3.2 Técnicas de extracción de contaminantes orgánicos halogenados en muestras líquidas

#### 1.3.2.1 Extracción en fase sólida (SPE)

## 1. Introducción

---

Este tipo de técnica de extracción<sup>82</sup> utiliza columnas o cartuchos rellenos de un material adsorbente sólido, de naturaleza similar a la de los analitos que se desean retener. La muestra líquida se hace pasar a través de la fase sólida adsorbente y los analitos se retienen en la fase sólida, para ser a continuación eluidos con un disolvente o mezcla de disolventes adecuada. Presenta varias ventajas como la reducción en el volumen de disolventes orgánicos necesarios, la fácil miniaturización y automatización, y permite alcanzar elevados factores de preconcentración.

Dentro de la SPE se ha desarrollado una variante como es la microextracción en fase sólida (SPME)<sup>83,84</sup> para la extracción de compuestos volátiles y semi-volátiles en agua y matrices gaseosas. Con este tipo de extracción se consigue la completa eliminación de los disolventes orgánicos, es rápida y económica, ya que únicamente se necesita una fibra que actúa como una fase estacionaria, de forma que los analitos se adsorberán sobre dicha fibra. Como desventaja de esta técnica se podría señalar la baja reproducibilidad. Una vez que los analitos se encuentran adsorbidos, se llevará a cabo la desorción térmica de los mismos.

Otra técnica de miniaturización desarrollada en los últimos años para la extracción de compuestos orgánicos en matrices acuosas es la extracción adsortiva con barra agitadora (SBSE). En esta técnica los analitos no polares o de una polaridad intermedia se adhieren, de acuerdo al coeficiente de partición entre el recubrimiento de la barra magnética y la fase acuosa, sobre la superficie de la barra magnética recubierta con 50-300  $\mu\text{L}$  de polidimetilsiloxano (PDMS), el siguiente paso será la desorción de los analitos. Utilizando esta técnica se pueden extraer y concentrar los analitos sin la necesidad de disolventes orgánicos, es una técnica rápida, de fácil manejo y con bajo volumen de muestra requerido.

### 1.3.2.2 Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción líquido-líquido (LLE) es una de las técnicas más utilizadas para la extracción y preconcentración de los analitos en muestras líquidos<sup>85</sup>. La base fundamental es la mezcla de dos disolventes (habitualmente agua como muestra y algún disolvente orgánico o mezcla de disolventes) de distinta naturaleza. Los analitos (normalmente compuestos orgánicos) se encuentran en la fase acuosa o adheridos a pequeñas partículas. Con la adición de un disolvente orgánico con una polaridad más parecida a los analitos, se producirá una transferencia de los mismos desde la fase

acuosa a la fase orgánica (con un determinado coeficiente de reparto entre ambas fases). Clásicamente, para llevar a cabo esta etapa de extracción se utilizaron grandes volúmenes de disolventes orgánicos, siendo esto una desventaja. Por ello, en los últimos años, se han desarrollado variantes de esta técnica (minimizando la cantidad de disolvente necesario) donde por medio de una gota de disolvente orgánico se lleva a cabo la extracción. Entre estas técnicas de miniaturización cabe destacar la microextracción en gota (SDME)<sup>86</sup>, donde por medio de un microjeringa se deposita una microgota (1-10 µL) de un disolvente orgánico adecuado en la muestra acuosa, ya sea por inmersión directa (SDME directo) o en modo espacio de cabeza (HS-SDME). Este tipo de técnica es sencilla, económica, rápida, no necesita una instrumentación específica y la cantidad de disolvente orgánico requerido es mínima. Como desventaja se podría señalar la inestabilidad de la gota.

### 1.3.3 Limpieza y preconcentración de los extractos

Tras la etapa de extracción, tanto de muestras sólidas como de muestras líquidas complejas, suele ser habitual en la mayoría de los procedimientos analíticos, una etapa de limpieza de los extractos, ya que junto con los analitos de interés, se pueden extraer otras sustancias de la matriz. Por este motivo, esta etapa de limpieza es recomendable para eliminar sustancias que pueden interferir en la cuantificación de los analitos, aumentar el fondo espectral, o ensuciar la instrumentación utilizada en las siguientes etapas del proceso, como son las etapas de separación y detección. La etapa de limpieza debería ser más exhaustiva cuando se utilizan detectores poco selectivos como detectores de ionización de llama (FID) o detectores por captura de electrones (ECD).

Dependiendo de la naturaleza de la matriz, las sustancias interferentes extraídas junto con los analitos a determinar pueden ser muy variadas desde lípidos, pigmentos, resinas, etc. Existen distintos procedimientos de limpieza de los extractos<sup>87, 88</sup> utilizados fundamentalmente para la limpieza de matrices de naturaleza biológica, como son las columnas cromatográficas de alúmina, sílica gel y Florisil®, o una combinación de estas sustancias adsorbentes. Las sustancias interferentes quedarán retenidas en este tipo de columnas en base a su polaridad. Por ejemplo, normalmente en las muestras medioambientales junto con los PCBs aparecen otro tipo de compuestos clorados (pesticidas organoclorados), debido a su diferente polaridad, los pesticidas organoclorados se retienen en la columna, de esta manera se pueden separar ambos tipos

## 1. Introducción

---

de compuestos; los lípidos también quedaría retenidos en la columna. Una ventaja de este tipo de técnica de limpieza es el bajo coste de las columnas, pudiendo ser fabricadas directamente por el usuario.

Otra técnica utilizada para la limpieza de los extractos es la cromatografía de permeación en gel (GPC). Esta es un tipo de cromatografía de exclusión por tamaños, donde los analitos se separarán en base a su tamaño, presenta ventajas como pueden ser la automatización, es una técnica no destructiva, y la columna se puede reutilizar. Como desventajas se pueden enumerar, la necesidad de utilizar grandes volúmenes de disolventes puros, y el elevado coste de las columnas cromatográficas. Las muestras medioambientales, como los sedimentos y suelos, tienen elevados contenidos de azufre, este se puede eliminar utilizando GPC, también, y de una forma más sencilla utilizando polvo de Cu.

Tras la etapa de limpieza, normalmente es necesario llevar a cabo una etapa de preconcentración, ya que los niveles de concentración a los que se encuentran los analitos en muestras reales son muy bajos. Algunas de las técnicas de extracción descritas anteriormente, son también técnicas de preconcentración como son la SPE (extracción en fase sólida), la SPME (microextracción en fase sólida), SBSE (extracción adsorbtiva con barra agitadora) y SDME (microextracción en gota), ya que en todas ellas la miniaturización y la propia definición de la técnica hace que se minimice o incluso se elimine la necesidad de utilizar disolventes orgánicos. También la preconcentración puede llevarse a cabo de forma sencilla utilizando una corriente de gas inerte como el N<sub>2</sub>, que permite reducir el volumen de la muestra a apenas unos microlitros o incluso a sequedad para luego redissolver la muestra en el volumen deseado siempre y cuando los analitos no se evaporen durante este proceso.

### **1.3.4 Técnicas de separación utilizadas en la determinación de contaminantes orgánicos halogenados en muestras reales**

La finalidad de las etapas anteriores del método analítico, como son la etapa de extracción de los analitos de la matriz en la que se encuentran, y las etapas de limpieza de los extractos, junto con la preconcentración de los mismos, tienen como objetivo aislar los analitos en un disolvente y a un nivel de concentración adecuado para su detección. Sin embargo, en el extracto final resultante no solo se encuentran los analitos de interés si no también, otras sustancias de una naturaleza similar que han sido

extraídas y no han sido eliminadas en ninguna de las etapas anteriores del proceso de preparación de muestra. Estas sustancias pueden interferir en la detección final por lo que es necesario la aplicación de una técnica de separación previa a la detección. Hoy en día, las técnicas de separación más utilizadas para la determinación de contaminantes orgánicos halogenados son las técnicas cromatográficas. La Cromatografía es una palabra derivada del griego donde *chromos* significa (color) y *graphein* (escritura). Según la IUPAC, la Cromatografía se puede definir como un método físico de separación en el cual los componentes a separar se encuentran distribuidos en dos fases, una de ellas es la fase estacionaria mientras que la otra es la fase móvil, que se mueve en una dirección definida. La fase estacionaria puede ser un sólido poroso o no poroso, o un líquido inmovilizado con un área superficial adecuada, que provoca la retención de los analitos. La fase móvil puede ser un gas, líquido o un líquido supercrítico, que se mueve a través de la fase estacionaria en base a distintos principios como son gravedad, fuerzas capilares o presión. Es la naturaleza de la fase móvil la que determina el tipo de cromatografía. Las más utilizadas son la Cromatografía de Gases<sup>89,90</sup> (GC) donde la fase móvil es un gas, y la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia<sup>91</sup> (HPLC) donde la fase móvil es un líquido. La elección de una técnica u otra dependerá de la naturaleza de los analitos. Por ejemplo, la GC está limitada a analitos volátiles o semivolátiles térmicamente estables, aunque también hay que tener en cuenta que ciertos analitos se pueden hacer volátiles mediante una derivatización adecuada.

En las metodologías analíticas desarrolladas en la presente Tesis Doctoral, se ha utilizado la Cromatografía de Gases (GC) para la separación de los congéneres de PCBs, y la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) para la separación de los tres isómeros del HBCD. Por este motivo solamente se describirán en detalle estas dos técnicas en los siguientes apartados.

### 1.3.4.1 Cromatografía de Gases para la separación de PCBs

Debido a la relativa alta volatilidad de los PCBs y a su alta estabilidad térmica la Cromatografía de Gases<sup>92</sup> es la técnica de separación más utilizada para su determinación en muestras reales. La Cromatografía de Gases es una técnica de separación sencilla, de fácil manejo, rápida y que proporciona una buena resolución en mezclas complejas. Estas características son ideales para el análisis de muestras que contienen PCBs ya que pueden coexistir hasta 209 congéneres. Las columnas

## 1. Introducción

---

cromatográficas utilizadas actualmente son columnas capilares que pueden tener una distinta composición de la fase estacionaria, como por ejemplo DB-1 (composición 100% dimetilpolisiloxano) o una DB-5ms (composición 5% fenil y 95% dimetil arilen siloxano). En la bibliografía se puede encontrar publicaciones<sup>93,94</sup> donde se han utilizado otras fases estacionarias, aunque hay que tener siempre en cuenta que los 209 congéneres de PCBs no se pueden separar utilizando una única columna. En los últimos años, con el fin de aumentar la resolución cromatográfica se han comenzado a utilizar sistemas de GC bidimensionales (GC x GC)<sup>95,96</sup>. En estos sistemas se combinan dos columnas capilares que presentan distintos mecanismos de separación para obtener cromatogramas en dos dimensiones. A pesar de la mayor resolución cromatográfica obtenida, el tratamiento de los datos es más complejo lo que dificulta su implantación en análisis de rutina.

### 1.3.4.2 Cromatografía Líquida de Alta Eficacia para la separación de los isómeros del HBCD

La técnica habitual para la separación de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HBCD es la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia<sup>97</sup> (HPLC). En un primer momento la determinación de los isómeros del HBCD se realizó utilizando GC, sin embargo, se observó que a temperaturas por encima de los 160°C se produce la degradación térmica y/o la interconversión de los isómeros, de forma que utilizando la GC solamente se puede obtener el sumatorio de todos los isómeros. Por todo ello, el HPLC es la técnica utilizada para la determinación individual de cada uno de ellos, evitando así posibles degradaciones y obteniendo una buena separación cromatográfica de los mismos.

Las columnas cromatográficas de HPLC más utilizadas para la separación de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HBCD suelen ser columnas C-18. Para la separación de las parejas de enantiómeros  $\alpha(+)$ -,  $\alpha(-)$ -,  $\beta(+)$ -,  $\beta(-)$ -,  $\gamma(+)$ - y  $\gamma(-)$ -HBCD se utiliza otro tipo de columnas cromatográficas con relleno de fases de sílice modificada con ciclodextrina. También, como ocurría en la GC, la combinación en línea de dos separaciones con distinto mecanismo (cromatografía bidimensional) permite la separación de los isómeros del HBCD y de sus parejas enantioméricas.

Dentro de la técnica HPLC, existe una variante de la misma denominada Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficacia<sup>98,99</sup> (UHPLC o UPLC). Esta variante presenta algunas ventajas con respecto a la técnica HPLC como es la posibilidad de lograr separaciones

ultra-rápidas y de alta resolución, con un consumo de disolvente reducido, utilizando columnas rellenas con partículas de menor tamaño (partículas de tamaño menor a 2  $\mu\text{m}$ , frente a las 5  $\mu\text{m}$  utilizadas normalmente en HPLC), además el menor tamaño de las partículas del relleno requiere la aplicación de presiones más altas. Por ejemplo, en HPLC convencional se puede trabajar con presiones de hasta 600 bar, mientras que en UHPLC se pueden alcanzar presiones de hasta 1200 bar.

### 1.3.5 Técnicas de detección de contaminantes orgánicos halogenados

Existen numerosas técnicas para la detección de contaminantes orgánicos halogenados. Por ejemplo, para la determinación de PCBs se encuentran en la bibliografía multitud de trabajos, donde la técnica elegida es la detección por captura de electrones (ECD)<sup>100</sup>. La sensibilidad de esta técnica es elevada, para compuestos halogenados (electronegativos) susceptibles de captar electrones en la celda. En este tipo de detector se produce, entre dos electrodos, un campo eléctrico constante. Como los elementos electronegativos tienen tendencia a captar electrones, cuando discurren entre los dos electrodos se produce una disminución de la corriente eléctrica, y es este descenso en la densidad electrónica lo que se finalmente se monitoriza. Como ventajas caben destacar su elevada sensibilidad y selectividad (no responde a moléculas orgánicas como hidrocarburos, alcoholes y cetonas), sin embargo, como desventaja presenta un bajo rango lineal.

Existen otras técnicas de detección alternativas como, por ejemplo, los inmunoensayos<sup>101</sup>, mediante los cuales se puede proporcionar la estimación total de la contaminación por PCBs en muestras de suelos, aguas, muestras biológicas, etc. Este tipo de inmunoensayos se considera una técnica sensible y rápida. Es útil cuando se quiere dar una indicación global del nivel de contaminación.

A pesar de la existencia de las técnicas de detección anteriormente mencionadas, la gran mayoría de las determinaciones de contaminantes orgánicos halogenados se realiza utilizando la Espectrometría de Masas (MS) como técnica de detección e identificación final. A continuación se discutirá más en detalle esta técnica, describiendo los distintos tipos de componentes de los que consta un espectrómetro de masas, haciendo hincapié en los equipos utilizados a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

## 1. Introducción

---

### 1.3.5.1 La Espectrometría de Masas

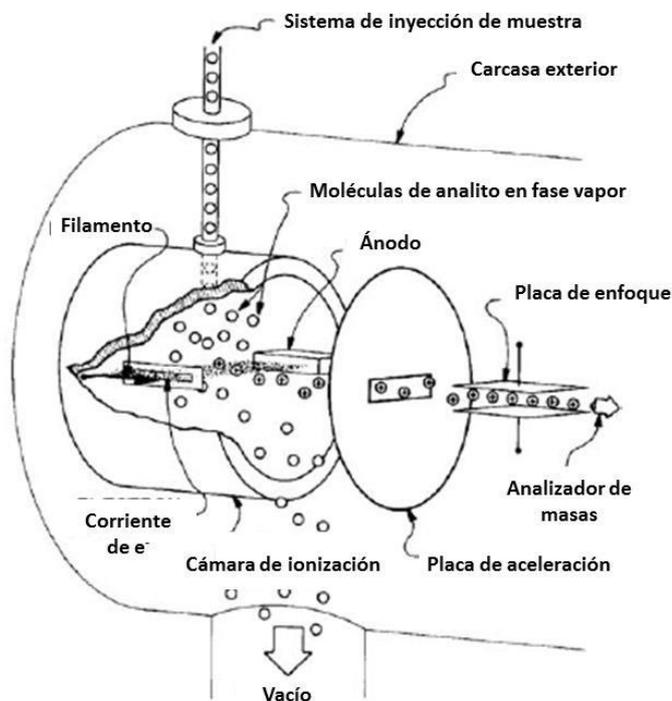
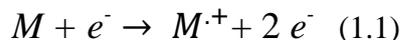
La Espectrometría de Masas (MS) es una de las técnicas analíticas instrumentales más utilizadas en la actualidad en análisis cualitativo y cuantitativo. Fundamentalmente un espectrómetro de masas consta de tres partes diferenciadas: una fuente de ionización, uno o varios analizadores de masas y un detector.

#### 1.3.5.1.1 Fuentes de ionización

La función principal de una fuente de ionización en MS es la de generar iones. Estos iones pueden ser elementales o moleculares, dependiendo del tipo de fuente de ionización utilizada. Aunque existe una amplia variedad de fuentes de ionización, solamente se explicaran en la siguiente sección, las fuentes utilizadas a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

- Ionización Electrónica (EI). Este tipo de fuente de ionización produce iones moleculares en fase gaseosa por choque entre las moléculas de analito y una corriente de electrones ( $e^-$ ). Los electrones se generan en un filamento metálico de Re o W y son acelerados mediante la aplicación de un potencial (entre el filamento y un electrodo) de 70 eV. Las trayectorias de los analitos y la corriente de iones son perpendiculares. Tras la colisión y debido a repulsiones electrostáticas entre ambos se producen iones radicales de los analitos de una única carga positiva denominado ión molecular. Este ión radical se representa por  $M^{\cdot+}$  y proporciona información muy valiosa, ya que presenta el mismo peso molecular que el analito. La ecuación (1.1) muestra la reacción de formación de  $M^{\cdot+}$ . Los iones moleculares al ser radicales y poseer una elevada energía son lábiles y pueden sufrir posteriores procesos de fragmentación que dependen, y son específicos, de cada molécula orgánica original. Los fragmentos moleculares formados proporcionan por tanto información estructural adicional, que se utiliza para confirmar la presencia de la molécula en estudio. Para la mayoría de las moléculas orgánicas, el rendimiento de ionización dentro de la fuente es máximo en la región de los 70 eV y la fragmentación producida es reproducible independientemente del espectrómetro de masas utilizado. Existen por tanto, bibliotecas universales de fragmentación que pueden ser utilizadas para realizar identificaciones rápidas y fiables de compuestos desconocidos. Los iones producidos son atraídos a través de la rendija hacia las placas de aceleración, que mediante los potenciales adecuados “conducen” los iones hacia el analizador de

masas. En la Figura 1.6 se puede observar un esquema general de la fuente EI donde aparecen las partes más importantes de la misma<sup>102</sup>.



**Figura 1.6** Esquema de una fuente de ionización electrónica EI (imagen adaptada de la referencia<sup>102</sup>).

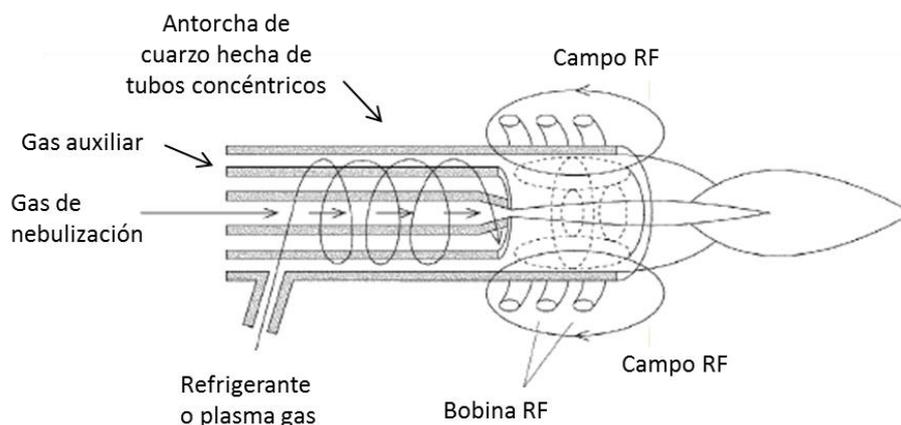
- **Ionización Química Negativa (NCI).** Estructuralmente esta fuente de ionización es muy parecida a la fuente EI. La diferencia que existe entre ambas es que la fuente NCI consta de un gas reactivo, generalmente metano, en la cámara de ionización<sup>103</sup>. Los electrones emitidos por el filamento incandescente como ocurre en EI chocan con las moléculas de gas reactivo, haciendo que la energía de los  $e^-$  disminuya, comportándose como electrones térmicos. Estos electrones térmicos ya no son capaces de formar iones radicales positivos ni fragmentar la molécula, sino que quedan libres pudiendo ser captados por moléculas que contengan átomos electronegativos (como ocurre en el caso de los PCBs con los átomos de Cl de la molécula). Este tipo de fuente de ionización se considera una fuente “suave” ya que no produce una gran fragmentación, y proporciona una gran sensibilidad cuando se analizan compuestos halogenados. La especie iónica predominante cuando se

## 1. Introducción

---

analizan PCBs en la fuente NCI es el ión  $\text{Cl}^-$  (de forma que las especies medidas para llevar a cabo la cuantificación son  $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$ ). Sin embargo, en muestras complejas donde, además de los PCBs existen otros compuestos clorados (como por ejemplo, pesticidas) hace que la selectividad que esta fuente sea muy baja.

- Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP). Esta fuente de ionización<sup>104</sup> consta de un plasma en el que se introduce la muestra nebulizada a modo de “spray”. El *plasma* es un gas parcialmente ionizado (normalmente el gas utilizado es argón), eléctricamente neutro en su conjunto y confinado en un campo electromagnético, existiendo un equilibrio entre partículas cargadas. En el plasma ICP la ionización se realiza mediante una corriente inducida de alta frecuencia. Para conseguir la ionización se hace circular el gas (Ar) por una serie de tubos concéntricos que constituyen la antorcha. Al final de la misma se encuentra una bobina de inducción, alimentada por un generador de radiofrecuencias. El principio de la ionización comienza con una chispa Tesla que luego se mantiene por la corriente de radiofrecuencias que fluye a través de la bobina de inducción. El efecto es la aparición de un campo magnético, cuyas líneas de fuerza se orientan axialmente a la bobina, e induce a los iones y electrones a moverse en órbitas circulares, creando corrientes eléctricas, que a causa del efecto Joule ocasionan un calentamiento de los gases, alcanzándose temperaturas de hasta 10000 K, y proporcionando la continuidad del plasma. De esta forma, en el plasma existen las siguientes especies: electrones libres, iones Ar, átomos de Ar excitados, átomos de Ar en estado fundamental y moléculas de Ar ionizadas y neutras. Las tres primeras especies energéticas indicadas son capaces de ceder su energía a los átomos de los elementos de la muestra introducida en el plasma. Estas energías son suficientes para excitar a la mayoría de los átomos del sistema periódico. En la Figura 1.7 se observa de forma esquemática la fuente ICP.



**Figura 1.7** Esquema de una fuente ICP (imagen adaptada manual Agilent Technologies 7500 Series ICP-MS Hardware manual, pag. 15).

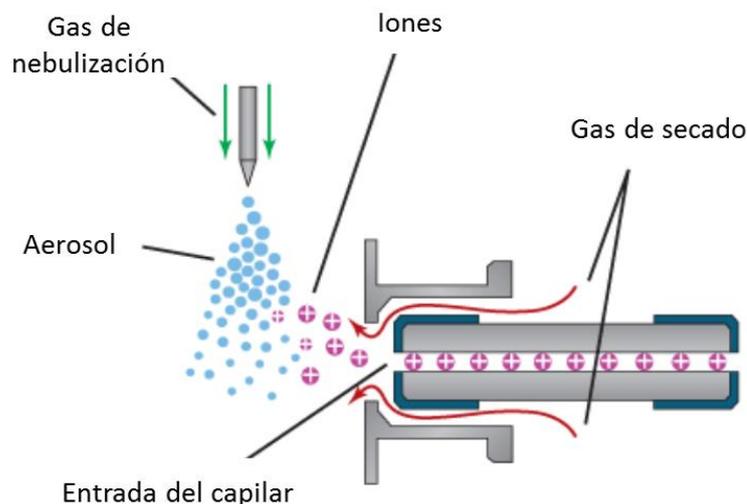
La técnica ICP-MS es una de las técnicas más poderosas en el análisis elemental, y por tanto en el análisis de especiación<sup>105,106</sup>. Sin embargo, su uso para la determinación de compuestos halogenados está limitado debido a su baja eficiencia de ionización, como consecuencia del elevado potencial de ionización que presentan los halógenos<sup>107,108</sup>. Por estas razones, la técnica GC-ICP-MS nunca ha sido utilizada anteriormente para la determinación de PCBs. De hecho, la única publicación que se puede encontrar en la bibliografía sobre la determinación de PCBs por ICP-MS está basada en la vaporización electrotérmica con la finalidad de distinguir el “cloro orgánico” del “cloro inorgánico”<sup>109</sup>.

- **Electrospray (ESI)**. Esta es una fuente de ionización molecular, donde el objetivo es transformar moléculas no volátiles en disolución a moléculas cargadas en fase gas. La carga de las moléculas puede ser positiva o negativa dependiendo fundamentalmente de la composición y del pH del medio en el que están disueltas<sup>110,111</sup>. La muestra se introduce en la fuente de ionización en forma de aerosol mediante el uso de un nebulizador. Entre la salida del nebulizador y la entrada en el espectrómetro de masas se establece una diferencia de potencial. Este potencial será positivo o negativo en función de la carga de la molécula, ya que su función es atraer las moléculas cargadas a la entrada del espectrómetro de masas. Las moléculas de analito experimentan, dentro de las gotas del aerosol, el campo eléctrico asociado a la diferencia de potencial aplicada de modo que se acumularán en la superficie de las gotas, las cuales quedan cargadas con una elevada densidad de carga superficial. A medida que el disolvente se evapora, las moléculas de analito se

## 1. Introducción

---

aproximan, se repelen y finalmente, cuando la repulsión entre las cargas vence la tensión superficial, las gotas explotan (Explosión de Coulomb) dejando libres en fase gas iones no fragmentados o formas iónicas del analito. En la Figura 1.8 se puede observar un esquema donde se representan las partes más importantes de la fuente ESI y el proceso de formación del spray (aerosol).



**Figura 1.8** Esquema de una fuente de ionización ESI (imagen adaptada manual Agilent Technologies 6400 Series Triple Quad LC/MS Concepts Guide, pag. 49).

La eficiencia de la ionización depende en gran medida de la composición de la fase móvil seleccionada<sup>112</sup>. Sin embargo, el principal inconveniente de esta fuente de ionización es la supresión de la señal del analito por los efectos de matriz<sup>113,114</sup>. La fuente ESI es una de las más utilizadas para compuestos termolábiles y de baja-media a muy alta polaridad que puedan ser ionizados en disolución, además, también permite el análisis de compuestos de elevado peso molecular mediante la formación de iones con múltiples cargas. Además de ESI, existen otras fuentes a presión atmosférica como son las fuentes de Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) y la fuente de Fotoionización a Presión Atmosférica (APPI)<sup>115,116</sup>. Tanto la APCI como la APPI requieren compuestos con una cierta volatilidad, y ambas requieren compuestos de alta a muy baja polaridad sin la necesidad de que se encuentren ionizados en disolución. En general, para las fuentes APCI y APPI los efectos de matriz no son tan acusados como en ESI. Cabe destacar que dependiendo de la naturaleza del analito y de las condiciones

de la separación, las fuentes ESI, APCI y APPI son complementarias, ya que una de ellas siempre es más apropiada que las otras.

### 1.3.5.1.2 Analizadores de masas

Los analizadores de masas utilizan campos magnéticos y/o eléctricos que pueden ser estáticos o dinámicos para acelerar iones y establecer trayectorias estables de los mismos según su relación  $m/z$  dentro del espectrómetro de masas. Existen distintos tipos de analizadores como son: analizadores de sector magnético, de cuadrupolo (Q), trampa de iones (IT), tiempo de vuelo (TOF), resonancia iónica ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICR) y Orbitrap, entre otros. El fundamento teórico para la separación de los iones en función de su  $m/z$  varía de un analizador a otro, así como la resolución de masa y la exactitud de masa obtenida. En la Tabla 1.2 se pueden observar algunas de las características que presentan los analizadores mencionados.

*Tabla 1.2 Tabla donde se comparan las características de algunos analizadores de masas (adaptada de referencia<sup>104</sup>).*

	Q	IT	TOF	Sector magnético	FT-ICR	Orbitrap
<b>Límite de masa (Th)</b>	4000	6000	> 100 000	20 000	30 000	50 000
<b>Resolución</b>	2000	4000	5000	100 000	500 000	100 000
<b>Exactitud (ppm)</b>	100	100	200	<10	<5	<5
<b>Muestreo de iones</b>	Continuo	Pulsado	Pulsado	Continuo	Pulsado	Pulsado
<b>Presión (Torr)</b>	$10^{-5}$	$10^{-3}$	$10^{-6}$	$10^{-6}$	$10^{-10}$	$10^{-10}$

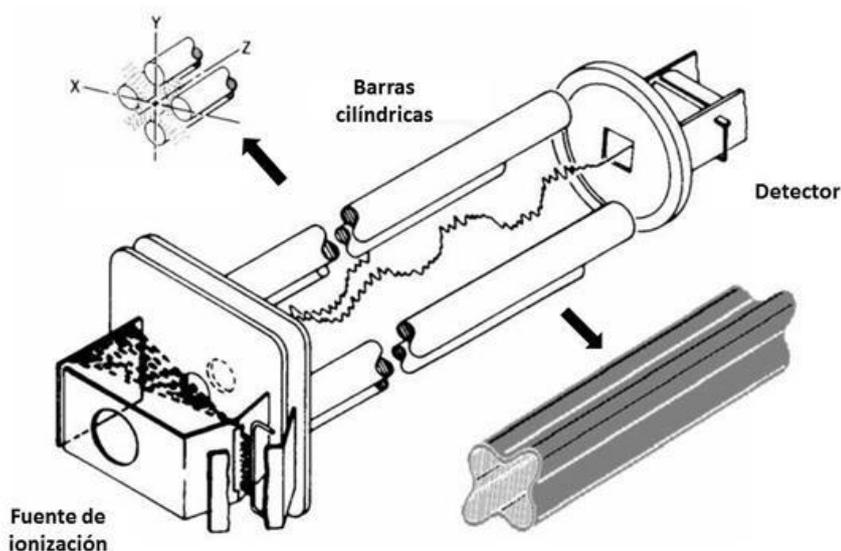
En la Tesis Doctoral que aquí se presenta se ha trabajado únicamente con analizadores de tipo cuadrupolo (Q) tanto de cuadrupolo sencillo como de triple cuadrupolo (QqQ)

## 1. Introducción

---

que permiten utilizar espectrometría de masas en tándem. A continuación se pasará a describir de forma resumida estos dos tipos de analizadores así como sus modos de operación.

- Cuadrupolo (Q). El cuadrupolo<sup>117</sup> es más compacto, tiene un menor coste y es más robusto que otros tipos de analizadores, como por ejemplo, el sector magnético. Además, emplea tiempos de barridos bajos (< 100 ms) lo que permite realizar barridos de masa durante la elución de picos cromatográficos. Como desventajas cabe resaltar su baja resolución y una menor sensibilidad (ver Tabla 1.2.). El cuadrupolo consta de cuatro barras metálicas de sección circular o hiperbólica, colocadas entre ellas en paralelo, formando una circunferencia de forma que el haz de iones que proviene de la fuente de ionización incida sobre el centro de las barras. En la Figura 1.9 se puede observar de forma esquemática este analizador. Los iones procedentes de la fuente son acelerados por un potencial e introducidos en el espacio entre las barras. Dos barras opuestas se conectan eléctricamente al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par al polo negativo. Además, se aplican a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencia que están desfasados 180°. En unas determinadas condiciones de operación se transmiten solo iones de un pequeño intervalo de relaciones m/z. El resto iones que no entran dentro de ese intervalo siguen trayectorias distintas y no consiguen atravesar el cuadrupolo para llegar al detector. Variando las señales eléctricas es posible variar el intervalo de valores m/z transmitidos. Este tipo de analizador permite resolver iones que tienen una diferencia de masas de una unidad de masa.



*Figura 1.9 Esquema del analizador de filtro cuadrupolar Q (imagen adaptada de referencia<sup>102</sup>).*

Existen dos modos de operación cuando se utilizan espectrómetros de masas de tipo cuadrupolo: modo barrido o SCAN donde se efectúa un barrido de los iones generados en la fuente de ionización en un determinado rango de masas, y el modo SIM que monitoriza solamente los iones seleccionados previamente.

- **Triple cuadrupolo (QqQ).** Un analizador de masas de tipo triple cuadrupolo<sup>117</sup> consta de dos cuadrupolos (Q1 y Q2) que actúan como analizadores de masas y una celda de colisión situada entre ellos. La celda de colisión puede ser otro cuadrupolo, un hexapolo o un octapolo. La celda de colisión se presuriza con un gas inerte ( $N_2$ , He, etc), con la finalidad de que los iones generados en la fuente de ionización (iones precursores) que atraviesan la celda colisionen con las moléculas de gas y fragmenten. La formación de iones producto causada por el choque de los iones precursores con el gas inerte en la celda de colisión se denominan disociación inducida por colisión (CID). Durante este proceso la energía cinética de los iones precursores se transforma en energía interna que se emplea para romper sus enlaces y formar iones producto. La generación de iones producto a partir de iones precursores permite la utilización de cuatro modos de medida en un equipo de triple cuadrupolo. Estos modos de adquisición son:

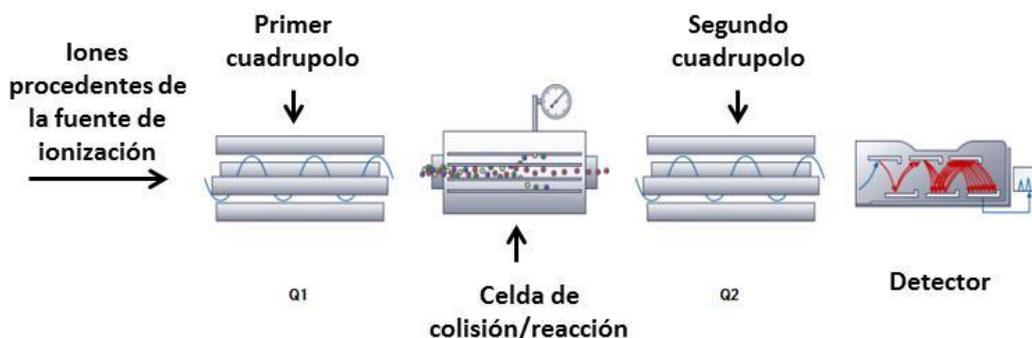
- **Barrido de iones producto**, donde el primer cuadrupolo trabaja en modo SIM, y el segundo cuadrupolo actúa en modo barrido o SCAN. Este modo tiene como

## 1. Introducción

---

finalidad estudiar el espectro de masas de todos los iones producto generados a partir de un único ion precursor filtrado en Q1.

- **Barrido de iones precursores.** En este modo de adquisición el primer cuadrupolo realiza un barrido en modo Scan, permitiendo la transmisión de todos los iones procedentes de una muestra, mientras que el segundo analizador se programa para registrar determinados fragmentos iónicos procedentes de la fragmentación en la celda de colisión. Este modo es muy útil como método de diagnóstico cuando el ión producto seleccionado es específico y común para una determinada familia de compuestos.
- **Barrido de pérdida neutra.** En este modo los dos analizadores de masas realizan un barrido de modo que el segundo analizador está programado a una determinada diferencia de masa respecto al primero. Esta diferencia corresponde a la pérdida de un determinado fragmento neutro de los iones procedentes del primer analizador de masas.
- **Monitorización de reacción selectiva** (Selected Reaction Monitoring, SRM). En este modo Q1 opera en modo Sim, seleccionando un determinado ion precursor que se fragmentará en la celda de colisión. Solamente uno de los iones producto generados será medido en modo SIM en el segundo cuadrupolo. Este último modo SRM se utiliza para mejorar la selectividad de la determinación con el “doble filtrado”, mejorando al mismo tiempo la relación señal/ruido y por tanto la sensibilidad de la determinación. Esto es especialmente útil cuando se analizan matrices complejas al eliminar prácticamente el fondo espectral. En la Figura 1.10 se muestra de forma esquemática la disposición del sistema triple cuadrupolo.



*Figura 1.10 Esquema del analizador triple cuadrupolo QqQ (imagen adaptada del software de adquisición ICP-MS MassHunter 4.2 Workstation software Agilent Technologies).*

### 1.3.5.1.3 Detectores

La finalidad del detector en un espectrómetro de masas es la de generar una corriente eléctrica o un voltaje a partir de los iones que atraviesan el analizador, y que esta corriente o voltaje sea proporcional a su abundancia. Un detector puede trabajar en dos modos: analógico o digital. En el modo analógico el detector mide directamente la corriente eléctrica generada por los iones incidentes. En el modo digital se miden el número de iones que alcanzan el detector por unidad de tiempo.

Existen distintos tipos de detectores de iones, como por ejemplo, la copa de Faraday, los multiplicadores de electrones, o los fotomultiplicadores. La elección de un detector u otro dependerá del diseño instrumental, y del tipo de espectrómetro de masas utilizado. Las copas de Faraday se utilizan fundamentalmente en espectrómetros de masas de tipo multicolector y se basan en la medida directa de la corriente eléctrica (modo analógico) que se produce cuando un ión golpea su superficie y se neutraliza donando o captando electrones.

En el caso del detector multiplicador de electrones, los iones generan partículas secundarias al colisionar sobre un dínodo de conversión que a su vez son convertidos en electrones en un siguiente dínodo. Mediante más colisiones en dínodos posteriores la corriente eléctrica se amplifica mediante un efecto cascada<sup>104</sup>. Este tipo de detector puede trabajar tanto en modo analógico como digital.

El fotomultiplicador o detector Daly combina la detección de iones y fotones. Los iones incidentes son en primer lugar convertidos en electrones tras colisionar en un dínodo de

## **1. Introducción**

---

conversión. Posteriormente los electrones generados se convierten en fotones mediante un centelleador (Scintillator) y finalmente los fotones se convierten en electrones mediante un fotomultiplicador.

### **1.4 DILUCIÓN ISOTÓPICA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS (IDMS)**

El análisis por dilución isotópica es la estrategia de cuantificación que se utilizará a lo largo de la presente Tesis Doctoral. Esta técnica hace uso de la existencia de los isótopos para llevar a cabo la cuantificación de un elemento o molécula en una muestra a partir de la medida de sus abundancias isotópicas mediante la Espectrometría de Masas. Está considerado como un método primario de análisis ya que los resultados obtenidos son directamente trazables al Sistema Internacional de unidades, permitiendo la corrección de la mayoría de los errores aleatorios y sistemáticos que pueden ocurrir a lo largo del proceso analítico.

#### **1.4.1 El concepto de isótopo**

Los isótopos son formas de un mismo elemento químico que poseen entre ellos el mismo número de protones y de electrones, pero diferente número de neutrones. La diferencia en el número de neutrones hace que cada uno de los isótopos de un mismo elemento presente diferente masa atómica. Sin embargo, los diferentes isótopos de un mismo elemento conservan las mismas propiedades físico-químicas.

Es necesario remarcar que la composición isotópica de los elementos de la tabla periódica se considera constante en la naturaleza en la Tierra, la Luna y los meteoritos. Sin embargo, hay algunas pequeñas diferencias para algunos elementos en la Tierra debido al fraccionamiento isotópico o el decaimiento radioactivo. De esta forma, se consideran constantes las composiciones isotópicas de los elementos en estudio, con sus correspondientes incertidumbres asociadas. La comisión de pesos atómicos y abundancias isotópicas de la IUPAC actualiza y publica periódicamente la composición isotópica de los elementos incluyendo su incertidumbre debido a las posibles variaciones naturales<sup>118</sup>.

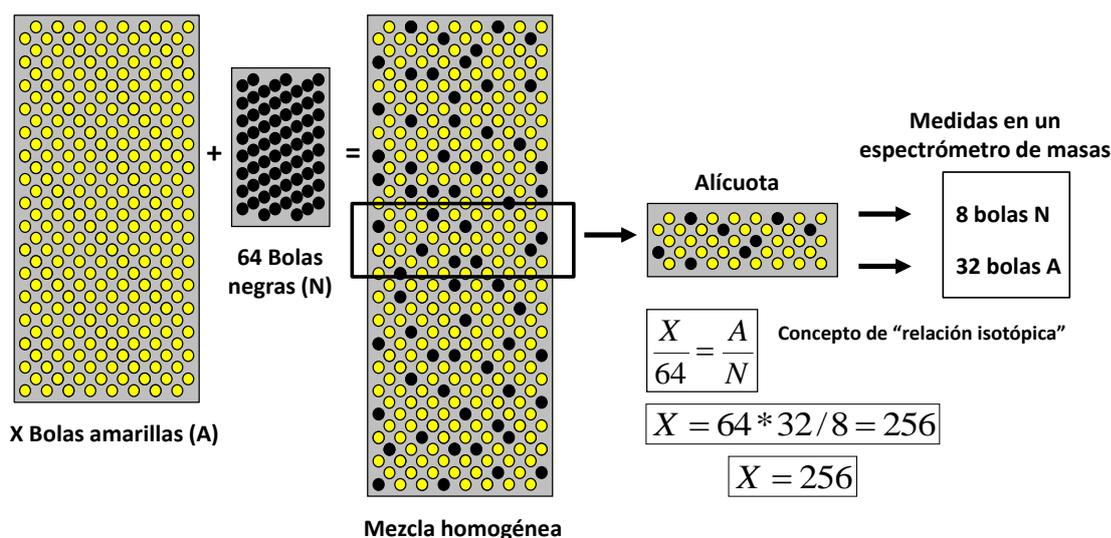
Hoy en día es posible modificar de forma artificial las abundancias isotópicas de los elementos y obtener elementos enriquecidos isotópicamente, donde un isótopo natural de baja abundancia se encuentre enriquecido en más de un 90%. La separación de los isótopos del mismo elemento químico es muy difícil debido a que poseen las mismas

propiedades químicas. Los métodos de separación de isótopos están basados, por tanto en las diferencias en sus propiedades físicas causadas por las pequeñas diferencias en su peso atómico. Entre estos métodos se pueden destacar los métodos de centrifugación gaseosa, la difusión gaseosa, la separación electromagnética (Calutrones) o las separaciones por láser.

### 1.4.2 Fundamentos teóricos del análisis por dilución isotópica

El análisis por dilución isotópica se basa en la modificación intencionada de la composición isotópica de un elemento o compuesto, que se quiere determinar en una muestra mediante la adición de ese mismo elemento o compuesto enriquecido isotópicamente. Este concepto se puede ilustrar de manera gráfica según la Figura 1.11, que hace referencia a un caso en el que se pretende determinar un número desconocido (X) de bolas amarillas (A) en una caja. Si el número de bolas amarillas a determinar es elevado, la opción de contar dichas bolas de una en una sería un proceso laborioso y sujeto a errores. Es en este punto cuando entra en juego el concepto de dilución isotópica, con la adición de un número conocido de bolas negras (N) a la caja que presentan la misma forma, tamaño y peso que las bolas amarillas. Una vez que se mezclan homogéneamente las bolas amarillas y las bolas negras, se recoge una alícuota representativa de la mezcla que posea un número de bolas que se pueda contar fácilmente. Contando tanto el número de bolas A como el número de bolas N en esa alícuota, y conociendo el número de bolas negras añadidas al principio se obtiene fácilmente el número de bolas A iniciales. Nótese que la relación de bolas amarillas y negras en la alícuota representativa ilustra el concepto de relación isotópica. Además, el proceso de contar las bolas amarillas y negras en la alícuota representativa ilustra el proceso de medida de la relación isotópica mediante Espectrometría de Masas.

## 1. Introducción



*Figura 1.11 Representación esquemática del concepto de dilución isotópica mediante el uso de bolas de colores: amarillas (A) a determinar con el uso de las bolas negras (N) utilizadas como "trazador isotópico".*

Una característica importante de esta forma de calcular el número de bolas A es que cualquier alícuota de la mezcla posee la misma relación A/N, por lo que cualquier pérdida de la muestra no afectaría al resultado final. Además, la relación A/N no depende del tamaño de la alícuota tomada aunque, por efectos estadísticos un número superior de bolas da una mejor precisión en la determinación.

El experimento descrito anteriormente fue empleado por primera vez en estudios ecológicos en 1895 por C. G. J. Petersen<sup>119</sup>, para estimar la población de una especie de pez (solla) en el fiordo de Limfjord en Dinamarca. Este tipo de experimentos consisten en capturar un grupo de individuos de la especie, marcarlos, devolverlos a su ecosistema y dejar que se mezclen con los individuos no marcados. Posteriormente se captura otro grupo de individuos y la proporción de peces no marcados frente a marcados proporciona la población total de peces del ecosistema. Obviamente, este tipo de experimentos solo se pueden realizar en ecosistemas cerrados. El análisis por dilución isotópica aplica este mismo principio para la cuantificación de compuestos químicos. Inicialmente se utilizaron isótopos radiactivos<sup>120</sup> pasando después al uso de isótopos estables enriquecidos<sup>121,122</sup>.

El aspecto más novedoso de la dilución isotópica es que hace uso de la existencia de los isótopos y de la medida de sus relaciones isotópicas mediante la Espectrometría de Masas para llevar a cabo la cuantificación de elementos o compuestos químicos. La

relación isotópica entre las formas marcada y no marcada del analito se mantiene constante, independientemente de la alícuota que se recoja, una vez que se haya conseguido la mezcla homogénea (equilibrio isotópico) entre la muestra y el trazador. De esta forma los resultados no se ven afectados por posibles variaciones de la sensibilidad instrumental, pérdidas de muestra, bajas recuperaciones o efectos de matriz. Por todo ello se considera que IDMS es un Método Primario de análisis trazable directamente al Sistema Internacional de Unidades.

La trazabilidad puede definirse como la propiedad del resultado de una medida o del valor de un patrón mediante la cual puede relacionarse con referencias establecidas, normalmente patrones nacionales o internacionales mediante una cadena ininterrumpida de comparaciones cada una de las cuales con su incertidumbre calculada<sup>123</sup>. En Química Analítica es de esperar que todos los métodos analíticos o procedimientos empleados sean trazables a las unidades básicas de medida del SI (kilogramo, mol, amperio, segundo, etc), ya sea directamente o después de una cadena de trazabilidad. Estos métodos trazables directamente al SI son denominados *Método Primarios de Análisis*, y son generalmente empleados en la preparación de materiales de referencia y para la validación de otros métodos analíticos de rutina. IDMS es, por tanto, considerado como un Método Primario de Análisis bajo unas condiciones específicas, siendo además la metodología de certificación preferida para la certificación de materiales de referencia por los Institutos Nacionales de Metrología.

### 1.4.3 Medida de la composición isotópica de elementos y moléculas

Como se ha comentado anteriormente, la composición isotópica de los elementos permanece constante en la naturaleza. Sin embargo, casi todos ellos presentan pequeñas variaciones en sus abundancias isotópicas debido a procesos de fraccionamiento isotópico o decaimiento radiactivo. Los rangos de las abundancias isotópicas que tienen en cuenta estas variaciones y sus incertidumbres asociadas están tabuladas por la IUPAC.

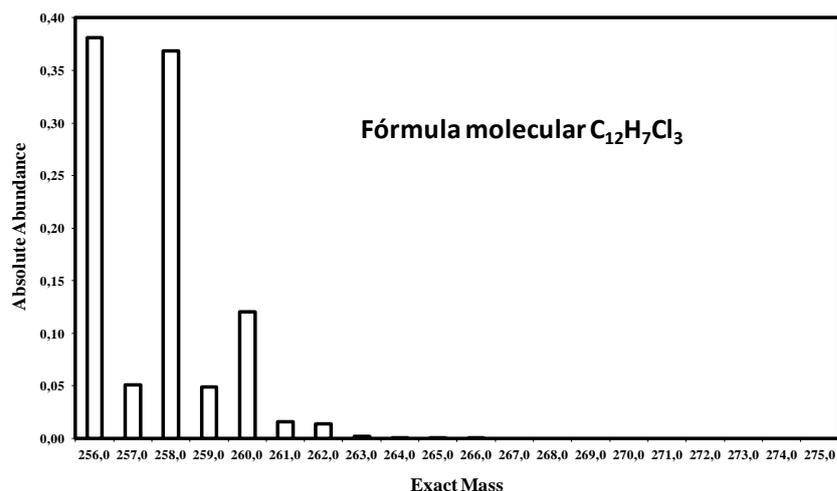
Cuando hablamos de elementos se puede definir el *perfil isotópico* o *distribución isotópica* como el conjunto de abundancias isotópicas relativas de cada uno de los isótopos estables del elemento. En el caso de compuestos químicos, el perfil isotópico molecular viene determinado por la abundancia relativa de cada uno de los isotopólogos que conforman la molécula. La suma de todas las abundancias isotópicas relativas de un

## 1. Introducción

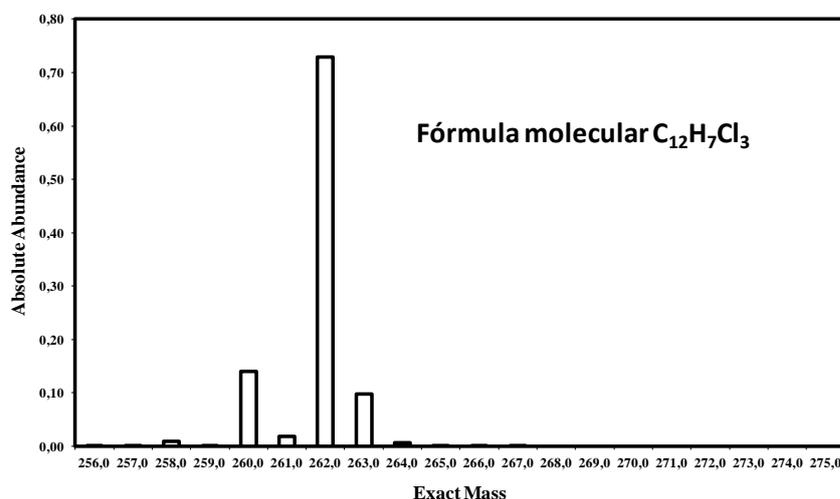
---

determinado perfil isotópico es por definición 1. Para el cálculo de la mencionada distribución isotópica es necesario hacer uso de la teoría de probabilidades utilizando la denominada *distribución binomial*. Se trata de cálculos estadísticos cíclicos, relativamente complejos, donde entran en juego las distintas combinaciones de los distintos elementos con sus correspondientes isótopos. Para facilitar el cálculo se pueden desarrollar programas informáticos como los basados en el algoritmo descrito por *Kubinyi*<sup>124</sup>, que permiten calcular incluso las incertidumbres asociadas a las abundancias isotópicas de cada uno de los isotopólogos de una molécula<sup>125</sup>. Con el uso de este tipo de programas se puede calcular de una forma muy sencilla la distribución isotópica del compuesto, ya que solamente es necesario introducir los elementos químicos y el número de elementos que forman la molécula en estudio. En la Figura 1.12 se observa el espectro de masas teórico, con abundancia isotópica natural para un PCB que presenta tres átomos de Cl.

Cuando se utiliza un compuesto enriquecido isotópicamente podemos hablar de perfil isotópico alterado. Este tipo de perfil muestra abundancias isotópicas claramente distintas a las naturales. El perfil isotópico alterado se calcula de la misma forma que el perfil isotópico natural. Para ello hay que incluir en el programa de cálculo utilizado el enriquecimiento isotópico del elemento enriquecido y el número de átomos enriquecidos que se introducen en el compuesto. En la Figura 1.13 se observa el espectro de masas de un PCB con tres átomos de cloro enriquecidos isotópicamente en <sup>37</sup>Cl, es decir, donde las abundancias isotópicas del Cl se han visto alteradas de forma intencionada para su uso como trazador isotópico.



*Figura 1.12 Distribución isotópica de un PCB con tres átomos de Cl de abundancia isotópica natural.*



*Figura 1.13 Distribución isotópica de un PCB con tres átomos de Cl enriquecidos en  $^{37}Cl$ .*

#### 1.4.4 La dilución isotópica en el análisis elemental

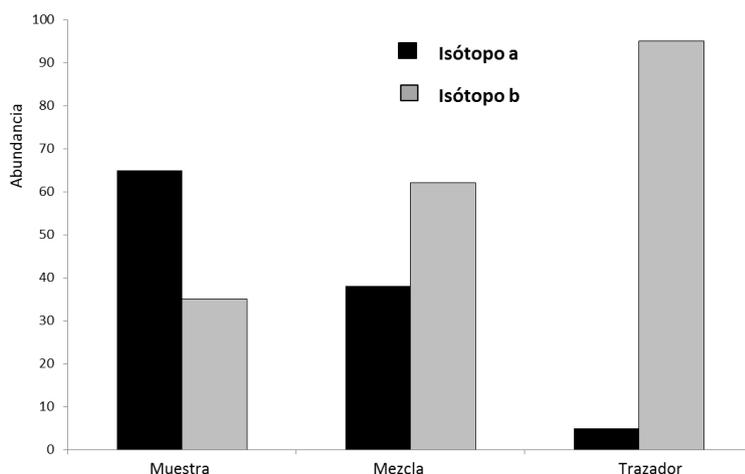
En análisis elemental, el análisis por dilución isotópica se basa en la alteración intencionada de las abundancias isotópicas del elemento a determinar en la muestra mediante la adición a la misma de una cantidad conocida de un isótopo enriquecido del mismo elemento (trazador). El elemento a analizar debe tener, por tanto, al menos dos isótopos estables, o uno estable y otro radioactivo de vida media larga, que se puedan medir sin interferencias espectrales mediante un Espectrómetro de Masas. La mayor

## 1. Introducción

parte de los elementos de la tabla periódica poseen más de un isótopo estable y pueden ser determinados mediante dilución isotópica.

El principio básico de la dilución isotópica en análisis elemental se ilustra en la Figura 1.14 para un elemento que contiene dos isótopos diferentes **a** y **b**. Como puede observarse el isótopo **a** es el más abundante en la muestra, mientras que el trazador está claramente enriquecido en el isótopo **b**. De este modo, las abundancias isotópicas de la mezcla de ambos (y por tanto, las relaciones isotópicas) serán intermedias entre las de la muestra y el trazador y dependerán tanto de la cantidad de trazador añadido como de la cantidad original del elemento en la muestra. Esto puede demostrarse matemáticamente si se denomina  $N_s$  al número de moles de un elemento poli-isotópico presente en la muestra y  $N_t$  al número de moles del mismo elemento en el trazador. De esta manera el número de moles del elemento en la mezcla  $N_m$  resultante vendrá dado por:

$$N_m = N_s + N_t \quad (1.2)$$



*Figura 1.14 Ilustración del principio de la dilución isotópica para un elemento de dos isótopos **a** y **b**, siendo **a** el isótopo mayoritario en el elemento natural y **b** el isótopo enriquecido utilizado.*

De la misma manera se pueden obtener balances de masa similares para los isótopos **a** y **b**:

$$N_m^a = N_s^a + N_t^a \quad (1.3)$$

$$N_m^b = N_s^b + N_t^b \quad (1.4)$$

Si se divide la ecuación (1.3) entre la ecuación (1.4) se obtiene la relación isotópica de ambos isótopos (**a/b**) en la mezcla ( $R_m$ ) la cual se puede expresar como:

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_s^a + N_t^a}{N_s^b + N_t^b} = \frac{N_s A_s^a + N_t A_t^a}{N_s A_s^b + N_t A_t^b} \quad (1.5)$$

donde  $N_s^a = N_s A_s^a$  ;  $N_t^a = N_t A_t^a$  ;  $N_s^b = N_s A_s^b$  ;  $N_t^b = N_t A_t^b$  si se tienen en cuenta las abundancias de los isótopos **a** y **b** en la muestra ( $A_s^a$  y  $A_s^b$ ) y en el trazador ( $A_t^a$  y  $A_t^b$ ) respectivamente. Despejando  $N_s$  en la ecuación (5) se obtiene la ecuación (1.6):

$$N_s = N_t \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (1.6)$$

La ecuación (1.6) es la forma más básica de la ecuación de la dilución isotópica y demuestra que conociendo la composición isotópica del elemento en el trazador y la muestra, y el número de moles añadidos de trazador, se puede calcular el número de moles del elemento en la muestra, solamente con la medida de la relación isotópica  $R_m$  en la mezcla. Esta ecuación se puede adaptar para expresar concentraciones utilizando los pesos atómicos del elemento natural y enriquecido, y los pesos tomados de la muestra y del trazador. Si se define  $R_S = \frac{A_S^b}{A_S^a}$  como la relación isotópica (**b/a**) en la muestra y  $R_t = \frac{A_t^a}{A_t^b}$  como la relación isotópica (**a/b**) en el trazador se puede expresar la ecuación (1.6) como:

$$N_s = N_t \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left( \frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_S} \right) \quad (1.7)$$

Utilizando las expresiones  $N_s = \frac{C_s \cdot m_s}{M_s}$  y  $N_t = \frac{C_t \cdot m_t}{M_t}$  donde:

- $C_s$  y  $C_t$  son las concentraciones del elemento en la muestra y en el trazador, respectivamente
- $m_s$  y  $m_t$  son la masa tomada de muestra y la masa añadida de trazador, respectivamente
- $M_s$  y  $M_t$  son los pesos atómicos del elemento en la muestra y en el trazador, respectivamente

## 1. Introducción

---

Se obtiene la ecuación final de la dilución isotópica en la que, con excepción de la relación isotópica  $R_m$ , todos los parámetros son conocidos, y por tanto, la concentración del elemento en la muestra  $C_s$  se determina con la simple medida de  $R_m$  mediante la Espectrometría de Masas.

$$C_s = C_t \cdot \frac{m_t}{m_s} \cdot \frac{M_s}{M_t} \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left( \frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad (1.8)$$

Como se puede observar en la ecuación (1.8) y, contrariamente a lo que ocurre en otras técnicas de cuantificación (por ejemplo, las adiciones estándar o la calibración externa), no existe ningún parámetro relativo a la sensibilidad instrumental. Por tanto, la primera ventaja del análisis por dilución isotópica es que, cualquier variación de sensibilidad debida a inestabilidades instrumentales como la deriva de la señal o los efectos de matriz no tendrá ninguna influencia en el valor final de la concentración del elemento en la muestra ( $C_s$ ).

Por otra parte, la incertidumbre en la medida de la concentración depende fundamentalmente de la incertidumbre de la medida de la relación isotópica  $R_m$ . Los pesos atómicos de la muestra y del trazador ( $M_s$  y  $M_t$ ) se conocen, y la masa tomada de muestra y trazador ( $m_s$  y  $m_t$ ) se puede determinar gravimétricamente. En la mayoría de los casos las abundancias isotópicas del analito ( $R_s$ ) son conocidas y coinciden con las tabuladas por la IUPAC. Por otra parte, las abundancias isotópicas del trazador ( $R_t$ ) se pueden determinar previamente o ser conocidas de antemano si se usa un trazador certificado. Por tanto, el único parámetro que tiene que ser determinado experimentalmente es  $R_m$ , y esta determinación se puede realizar con una elevada exactitud y precisión utilizando un espectrómetro de masas.

La tercera ventaja más relevante del análisis por dilución isotópica para análisis elemental es que, una vez alcanzado el equilibrio isotópico entre la muestra y el trazador, cualquier pérdida de sustancia de la mezcla no va a tener ninguna influencia en el resultado final. Esto se debe al hecho de que cualquier alícuota de la muestra diluida isotópicamente contendrá la misma relación  $R_m$  y por tanto, no habrá necesidad de conocer los factores de dilución o preconcentración realizados, ni tener en cuenta separaciones no cuantitativas o procesos de evaporación. Además, cabe resaltar que como la medida de  $R_m$  proporciona directamente la concentración inicial del elemento en la muestra, no es necesario recurrir a la calibración externa instrumental ni a métodos

de adiciones estándar, por lo que en IDMS se consigue un ahorro considerable en el tiempo de análisis respecto a los métodos analíticos convencionales.

Sin embargo, para que todas estas afirmaciones sean veraces se han de cumplir algunos requisitos. En primer lugar, se tiene que tener en cuenta que cualquier pérdida de sustancia (ya sea de muestra o de trazador) antes de que se produzca el equilibrio isotópico será una fuente de error importante. Además, una vez que se haya alcanzado el equilibrio isotópico, el isótopo enriquecido añadido a la muestra deberá comportarse de una manera idéntica respecto al elemento natural a lo largo de todo el proceso analítico. Por ejemplo, el estado de oxidación del elemento natural y del trazador debe ser el mismo. Por otra parte, la medida de las intensidades de los isótopos **a** y **b** realizada por el espectrómetro de masas debe estar libre de interferencias espectrales, y los factores que afectan a la exactitud de la medida de las relaciones isotópicas (como la discriminación de masas o el tiempo muerto del detector) deben estar controlados. Finalmente, también se han de controlar exhaustivamente los valores del blanco ya que cualquier tipo de contaminación que afecte a la muestra isotópicamente diluida conducirá a valores erróneos de  $R_m$ . Es importante resaltar que en el caso de que cualquiera de estos requisitos no se cumpla, la relación isotópica medida no proporcionará un valor exacto de la concentración inicial del elemento en la muestra<sup>126</sup>.

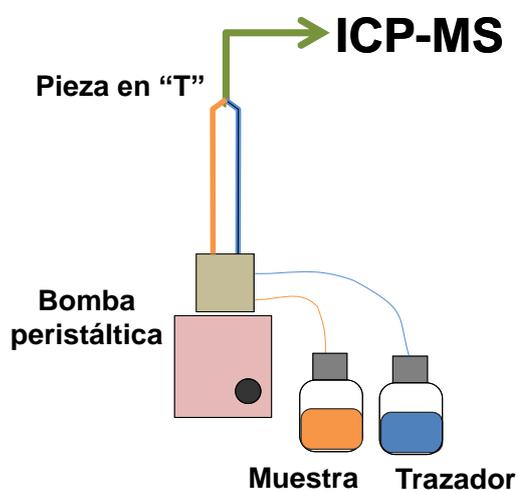
### 1.4.5 La dilución isotópica “en línea”

El concepto de dilución isotópica “en línea” fue descrito por Lásztity y colaboradores en 1989 para análisis elemental<sup>127</sup> y fue expandido al análisis de especiación por Heumann en 1994<sup>128</sup>. En la dilución isotópica “en línea”, la muestra que contiene el elemento o el compuesto a determinar se mezcla en un sistema en flujo con el elemento o compuesto enriquecido isotópicamente. El flujo de trazador  $F_t$  se mantiene constante durante todo el experimento mientras que el flujo del analito en la muestra  $F_s$  puede ser constante o variable. Un flujo variable de analito se puede obtener mediante análisis de inyección en flujo (FIA) o durante una separación cromatográfica, por Cromatografía de Gases o por Cromatografía de Líquidos. El equilibrio isotópico entre muestra y trazador es un parámetro muy crítico que, dependiendo de la fuente de ionización empleada, puede tener lugar dentro de la propia fuente o antes de que el flujo de la mezcla llegue a la fuente mediante reacciones químicas apropiadas. La gran capacidad de atomización del plasma de acoplamiento inductivo (ICP) hace que la sensibilidad analítica dependa

## 1. Introducción

---

únicamente de la cantidad de elemento presente en el plasma y sea independiente de la forma química en la que se presenta. Por tanto, la inmensa mayoría de aplicaciones que utilizan este concepto hacen uso de esta fuente de ionización, aunque siempre es recomendable demostrar que la sensibilidad es independiente del compuesto mediante la medida de patrones analíticos de distintos compuesto de un mismo elemento. Una vez demostrado, la forma química del trazador isotópico que se emplee, no va a tener influencia en el resultado final. En la Figura 1.15 se puede observar de forma esquemática la configuración instrumental para llevar a cabo determinaciones elementales por dilución isotópica “en línea”.



**Figura 1.15** Configuración instrumental para la realización de la dilución isotópica “en línea” para análisis elemental utilizando un ICP-MS.

La dilución isotópica “en línea” presenta ciertas ventajas frente a los métodos de IDMS clásicos. Por ejemplo, se puede utilizar un mismo trazador isotópico para determinar varios compuestos de un mismo elemento, incluso compuestos de estructura desconocida. Además, es el único método de cuantificación que proporciona determinaciones en tiempo real. Finalmente, este procedimiento permite cuantificar compuestos de los que no se posean patrones analíticos (de abundancia natural o enriquecidos isotópicamente) como el caso de biomoléculas complejas, siempre que se demuestre que la sensibilidad de la fuente de ionización es independiente de la forma química del compuesto que se estudia (mediante el análisis de compuestos análogos). Sin embargo, la mayor desventaja de la dilución isotópica en línea frente a los métodos

convencionales de IDMS reside en la imposibilidad de corregir las pérdidas de sustancia, antes de que se produzca el equilibrio isotópico. Por tanto, como todos los errores debidos a la preparación previa de la muestra no se pueden corregir, las determinaciones obtenidas mediante IDMS en línea no son directamente trazables al SI.

### 1.4.6 La dilución isotópica en el análisis de especiación elemental

El análisis por dilución isotópica también se ha aplicado en análisis de especiación elemental, es decir, a la determinación de las distintas formas químicas en las que un elemento está presente en una muestra. Para ello se utilizan técnicas híbridas, dónde se hace necesario una separación, normalmente cromatográfica (GC o HPLC) previa a la detección. Dependiendo de en qué momento y en qué forma química se añada el trazador isotópico a la muestra se puede hablar de dos modos de trabajo: el modo “*específico*” y el modo “*inespecífico*” o “*post-columna*”.

#### 1.4.6.1 La dilución isotópica *inespecífica* o “*post-columna*” en especiación elemental

La dilución isotópica “en línea” explicada en el apartado anterior se ha utilizado ampliamente en el campo del análisis de especiación. La adición del trazador isotópico se realiza tras la separación, normalmente cromatográfica, de las especies endógenas de la muestra (adición *post-columna*). En este caso el trazador se puede añadir en una forma química distinta a las formas químicas presentes en la muestra, ya que los únicos requisitos que se han de cumplir son: i) que no haya pérdidas de sustancia antes de la adición del trazador y ii) que el trazador y las especies a analizar (previamente separadas) se mezclen completamente antes del proceso de ionización permitiendo, de esta manera, una medida exacta de las relaciones isotópicas. Este modo es especialmente útil no solo cuando no se conoce con exactitud la estructura y composición de las especies a analizar, sino también cuando las correspondientes especies enriquecidas isotópicamente no están disponibles comercialmente o no se pueden sintetizar. Sin embargo, cualquier pérdida de sustancia que ocurra antes de la separación cromatográfica no puede ser corregida. A pesar de todo, este modo es la única alternativa para la cuantificación del elemento en una especie dada cuando no se disponen de patrones de las especies a analizar. Con dichas técnicas es posible la cuantificación fiable de biomoléculas complicadas o complejos metal-proteína así como la determinación de su composición estequiométrica elemental.

## 1. Introducción

---

### 1.4.6.2 La dilución isotópica específica en especiación elemental

En el modo específico se requiere el uso de un trazador que contenga las especies a analizar marcadas isotópicamente. Por tanto, al contrario que en el modo inespecífico, la composición y estructura de las especies de interés ha de ser perfectamente conocida, para sintetizar las especies enriquecidas isotópicamente (o bien adquirirlas si están disponibles comercialmente). Las especies enriquecidas se añaden a la muestra al principio del proceso analítico y, una vez alcanzada la mezcla total entre las especies añadidas y las especies endógenas de la muestra, el modo específico proporciona todas las ventajas ofrecidas por la dilución isotópica elemental. Este modo es análogo a la dilución isotópica en el análisis de compuestos orgánicos, que se describirá más adelante, pero muestra una serie de diferencias importantes:

- La primera de ellas es que los trazadores están enriquecidos en el heteroátomo de la molécula (p. ej. Hg, Sn, Pb, etc) y no en  $^{13}\text{C}$  o deuterio. Este hecho hace que el comportamiento químico de las especies marcadas sea totalmente análogo al de las especies no marcadas.
- El Espectrómetro de Masas utilizado normalmente es un ICP-MS que proporciona información elemental, por lo que la medida de la relación isotópica se realiza solamente en el heteroátomo, y se pueden aplicar las ecuaciones de la dilución isotópica elemental en cada pico cromatográfico.
- Otra diferencia destacable es que para la mayor parte de los elementos, se pueden escoger varios isótopos en los que se pueden enriquecer las distintas especies de interés. Esto es especialmente útil cuando se tienen que analizar varias especies del mismo elemento, y existe riesgo de transformaciones o interconversiones entre las mismas. Si cada especie a analizar se enriquece en un isótopo distinto es posible realizar la corrección de estas transformaciones, y la cuantificación simultánea de todas las especies en la muestra.

Así pues, es posible distinguir entre trazadores isotópicos sencillos (en los que todas las especies a analizar están enriquecidas en el mismo isótopo) y trazadores isotópicos múltiples (en los que cada especie de interés está enriquecida en un isótopo distinto).

Con el uso de trazadores isotópicos sencillos se puede usar directamente la ecuación general de la dilución isotópica (ecuación (8)) siempre que la relación isotópica medida en la mezcla  $R_m$  corresponda al heteroátomo de la molécula. Esto ocurre normalmente cuando se utiliza un ICP-MS como sistema de detección debido a la naturaleza atómica de esta fuente de iones. Sin embargo, cuando se utilizan fuentes de iones moleculares, como la fuente de ionización electrónica (EI), las relaciones isotópicas se miden en fragmentos moleculares. En estos casos es muy importante asegurar no solo que el fragmento seleccionado es puro, sino también que las abundancias isotópicas del  $^{13}\text{C}$  y del  $^2\text{H}$  se corrigen en la relación isotópica correspondiente.

El modo específico proporciona todas las ventajas del análisis por dilución isotópica convencional. El único requisito que debe cumplirse es que se produzca equilibrio isotópico entre las especies enriquecidas isotópicamente y las endógenas de la muestra. En el caso en que todas las especies estén en disolución este proceso de equilibrado es incluso más sencillo que en la dilución isotópica elemental, puesto que las especies añadidas son las mismas que las originalmente presentes en la muestra. Sin embargo, cuando las especies a analizar están presentes en una muestra sólida y el trazador se añade en disolución, la única manera de asegurar el equilibrio isotópico completo entre las mismas es conseguir la extracción cuantitativa de las especies naturales desde la matriz sólida a un extractante líquido apropiado, donde se puedan mezclar completamente. Siempre se debe tener en cuenta que un equilibrio isotópico completo, no significa un intercambio isotópico entre las especies del trazador y las de la muestra. Dicho intercambio afectaría al resultado final cuando se determinan varias especies del mismo elemento. Por tanto, en este tipo de aplicaciones es más adecuado hablar de la mezcla total de las especies en lugar de equilibrio isotópico completo entre las mismas como requisito fundamental para obtener resultados fiables<sup>129</sup>.

Por otro lado, el uso de trazadores múltiples en especiación elemental tiene dos objetivos fundamentales: por un lado, el estudio de los procesos de formación y degradación de especies en ecosistemas naturales (como la alquilación o desalquilación de especies metálicas) y, por otro, la corrección de posibles reacciones de degradación o interconversión durante el análisis químico. Los trazadores múltiples están constituidos por una mezcla de las especies en estudio, pero cada una de ellas enriquecida en un isótopo diferente. Idealmente estas mezclas se añaden a la muestra o al sistema de interés para medir la variación de las relaciones isotópicas de todas las especies con el

## 1. Introducción

---

tiempo. Dependiendo de la complejidad del modelo de interconversión se necesitará un mayor o menor número de isótopos enriquecidos para resolver los correspondientes modelos matemáticos. Hasta la fecha solamente se han estudiado con trazadores múltiples especies de tres elementos Sn<sup>130,131</sup>, Hg<sup>132,133,134</sup> y Cr<sup>135,136</sup>.

Los aspectos más importantes a tener en cuenta cuando se aplican metodologías de trazadores isotópicos múltiples en especiación son: i) efectos de matriz en las interconversiones ii) equilibrio isotópico antes de la interconversión y iii) extracción cuantitativa en el análisis de muestras sólidas. Estos aspectos hacen que la aplicación correcta de este tipo de metodologías requiera el análisis de muestras reales y de materiales de referencia certificados. Por ejemplo, aunque se aplique el mismo procedimiento de extracción en una muestra sólida, las interconversiones o degradaciones de las especies a analizar que se generan dependen del tipo de matriz que se analiza, incluso cuando se comparan matrices similares.

### 1.4.7 La dilución isotópica en el análisis de compuestos orgánicos

En los apartados anteriores se han descrito las distintas “modalidades” de la dilución isotópica en análisis elemental y análisis de especiación utilizando la Espectrometría de Masas como técnica de detección y la ecuación (1.8) para realizar la cuantificación de los analitos. Estas modalidades se han clasificado dentro de la dilución isotópica “inorgánica”. Sin embargo, el análisis por dilución isotópica se ha aplicado extensamente en el campo del análisis de compuestos orgánicos desde los años setenta. A lo largo de estos años, la teoría de la dilución isotópica orgánica ha evolucionado independientemente de la dilución isotópica inorgánica. En este caso el enriquecimiento isotópico se realiza normalmente en uno o varios átomos de C, H, O o N del compuesto orgánico a analizar. Podemos hablar por tanto de compuestos enriquecidos en <sup>13</sup>C, compuestos deuterados (<sup>2</sup>H) o compuestos enriquecidos en otros isótopos como <sup>15</sup>N u <sup>18</sup>O. Al igual que en el análisis por dilución isotópica inorgánica, el principio básico reside en obtener la concentración del analito por medio de la relación isotópica en la mezcla muestra-trazador, la cual debe mantenerse constante a lo largo de los distintos procesos analíticos. Sin embargo, existen dos diferencias importantes respecto a la dilución isotópica inorgánica:

- a) En dilución isotópica orgánica, las diferencias de masa entre el trazador y la muestra pueden producir pequeñas diferencias en las propiedades físico-químicas de ambos,

dando lugar a lo que se conoce como “efectos isotópicos”. Los efectos isotópicos se observan principalmente en compuestos deuterados, ya que la diferencia de masa entre  $^2\text{H}$  y  $^1\text{H}$  es proporcionalmente más grande que entre  $^{13}\text{C}$  y  $^{12}\text{C}$  o entre  $^{15}\text{N}$  y  $^{14}\text{N}$ .

b) Por otra parte, las fuentes de ionización utilizadas en el campo del análisis orgánico, como la fuente de ionización electrónica (EI) o el electrospray (ESI), producen perfiles isotópicos de fragmentos moleculares. Debido a la presencia natural de los isótopos minoritarios ( $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ ) un determinado compuesto orgánico produce un clúster isotópico para cada fragmento molecular en el que se incluye, no solo la masa nominal  $m$  del fragmento, sino también (y en menor medida) las masas  $m+1$ ,  $m+2$  o incluso mayores. Por tanto, cuando se introduce un compuesto marcado isotópicamente en una muestra existe la posibilidad de que ocurra un “solapamiento espectral” entre muestra y trazador, que se suele evitar trabajando con trazadores que posean una masa significativamente distinta a la del compuesto de abundancias isotópicas naturales. Esto se consigue enriqueciendo isotópicamente varios átomos de la molécula que se quiere determinar.

En IDMS “inorgánica” la concentración del analito en la muestra se obtiene de forma directa con la medida de la relación o las abundancias isotópicas en la mezcla. Sin embargo, desde los años setenta del siglo pasado en IDMS orgánica se ha seguido un método alternativo, debido a las dificultades instrumentales que existían por aquel tiempo para medir la composición isotópica de los análogos enriquecidos isotópicamente. Por esta razón Pickup y McPherson propusieron una aproximación empírica para conocer la dependencia entre la relación de moles y la relación isotópica entre el analito y el análogo enriquecido. Esta aproximación está basada en la medida de la relación isotópica o abundancia isotópica en mezclas definidas de trazador-analito. En estos casos el trazador se utiliza como patrón interno análogo al analito a determinar. Los trazadores isotópicos son considerados patrones internos ideales, ya que poseen la misma estructura química del analito, y en teoría, las mismas propiedades físico-químicas.

La aproximación empírica propuesta por Pickup and McPherson parte de la ecuación (1.5) en la que si se divide el numerador y el denominador por el número de moles de trazador ( $N_t$ ), se obtiene:

## 1. Introducción

---

$$R_m = \frac{\frac{N_s}{N_t} \cdot A_S^a + A_t^a}{\frac{N_s}{N_t} \cdot A_S^b + A_t^b} \quad (1.9)$$

La ecuación (1.9) es la forma básica de la ecuación de la dilución isotópica orgánica empleada con curvas de calibración propuesta por Pickup y McPherson en 1976<sup>137</sup>. La curva de calibrado obtenida es lineal cuando no existen solapamientos espectrales entre la muestra y el trazador, ya que la ausencia de solapamiento espectral implica que la abundancia del isótopo de referencia del trazador en el compuesto natural ( $A_S^b$ ) es cero, al igual que la abundancia del isótopo de referencia del compuesto natural en el trazador ( $A_t^a$ ). Bajo estas condiciones la ecuación (1.9) se puede expresar como:

$$R_m = \frac{N_s}{N_t} \cdot \frac{A_S^a}{A_t^b} \quad (1.10)$$

De esta manera, cuando se representa  $R_m$  en función de la relación del número de moles  $N_s/N_t$  se obtiene una recta de pendiente  $\frac{A_S^a}{A_t^b}$  y ordenada en el origen cero. Hay que tener en cuenta que si existieran efectos isotópicos entre el compuesto de abundancia natural y el trazador, la pendiente puede verse modificada.

Siguiendo esta aproximación empírica, podemos concluir que una vez realizada la curva de calibración, la medida de  $R_m$  en la muestra isotópicamente diluida proporcionará directamente el número de moles de compuesto natural. Llevando un control gravimétrico o volumétrico correcto de las cantidades de trazador, patrón natural y muestra, se puede cuantificar la concentración del analito en la muestra sin necesidad de conocer ni las abundancias isotópicas ni la concentración del trazador empleado, siempre y cuando se emplee la misma disolución de trazador en los patrones y en las muestras. Esto es una ventaja respecto a la dilución isotópica inorgánica, donde siempre se requiere la caracterización previa de los trazadores isotópicos empleados. Sin embargo, como mayor desventaja podemos resaltar la necesidad de tener que realizar un calibrado metodológico para cuantificar una muestra, lo cual hace que el tiempo de análisis sea mucho mayor que en dilución isotópica “inorgánica”.

### 1.4.7.1 Deconvolución de perfiles isotópicos para la cuantificación de compuestos orgánicos por IDMS

La deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) es una herramienta matemática que permite obtener, mediante la aplicación de la regresión lineal múltiple, directamente las fracciones molares del compuesto característico y de su análogo enriquecido, a partir del espectro de masas experimental de la mezcla. De este modo se evita la realización de un calibrado metodológico que se emplea en los métodos tradicionales para evaluar la dependencia entre relación de intensidades y relación de moles, lo cual disminuye considerablemente el tiempo de análisis.

Para aplicar esta metodología es necesario plantear un balance de masas para el número de moles totales del compuesto en la muestra ( $N_m$ ), que vendrá dado por:

$$N_m = N_s + N_t \quad (1.11)$$

Donde:

$N_s$  es el número de moles desconocidos del elemento de abundancia isotópica natural

$N_t$  son los moles del trazador

El balance de masas de la ecuación (1.11) puede hacerse también para todos y cada uno de los isotopólogos del compuesto que configuran su perfil isotópico. Por ejemplo, para un isotopólogo cualquiera  $i$  el balance de masas sería:

$$N_m^i = N_s^i + N_t^i \quad (1.12)$$

La ecuación (1.12) se puede expresar como una combinación lineal de la cantidad total del compuesto, en cada uno de los perfiles isotópicos y de las abundancias isotópicas conocidas o medidas de cada perfil según:

$$N_m \cdot A_m^i = N_s \times A_s^i + N_t \times A_t^i \quad (1.13)$$

Donde  $A_m^i, A_s^i, A_t^i$  son las abundancias isotópicas del isotopólogo  $i$  en cada uno de los perfiles isotópicos. Si dividimos la ecuación (1.13) por la ecuación (1.12) se obtiene la expresión:

$$A_m^i = X_s \times A_s^i + X_t \times A_t^i \quad (1.14)$$

## 1. Introducción

---

Donde:

$$X_s = \frac{N_s}{N_s + N_t}, X_t = \frac{N_t}{N_s + N_t} \quad (1.15)$$

$X_s$  y  $X_t$  son las fracciones molares del analito de abundancia isotópica natural y del trazador de abundancia isotópica alterada.

En IDMS orgánica, generalmente un elemento o compuesto orgánico suele presentar diferentes composiciones isotópicas a  $n$  masas diferentes, por lo tanto las ecuaciones para estas masas nominales se pueden expresar como notación matricial de la forma:

$$\begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ A_m^3 \\ \dots \\ A_m^{n-1} \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_s^1 & A_t^1 \\ A_s^2 & A_t^2 \\ A_s^3 & A_t^3 \\ \dots & \dots \\ A_s^{n-1} & A_t^{n-1} \\ A_s^n & A_t^n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x_s \\ x_t \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (1.16)$$

El número mínimo de grados de libertad necesarios para poder resolver el sistema de ecuaciones es de dos, por lo que será necesario plantear al menos dos ecuaciones ( $n \geq 2$ ), que permitirán obtener los valores de las fracciones molares mediante un ajuste por mínimos cuadrados del vector error  $e$ .

Las soluciones a la ecuación (1.16) son las fracciones molares del compuesto natural ( $X_s$ ) y el compuesto enriquecido isotópicamente ( $X_t$ ). Todos los cálculos matriciales pueden resolverse de una forma sencilla utilizando una hoja de cálculo mediante la función *ESTIMACION.LINEAL* de *Microsoft Excel*, que permite obtener directamente las fracciones molares junto con sus incertidumbres<sup>126</sup>.

A partir de la relación de estas fracciones molares se obtiene directamente el número de moles de compuesto natural ( $N_s$ ) según la ecuación (1.17), ya que se conoce el número de moles de compuesto enriquecido o trazador añadido al comienzo del proceso ( $N_t$ ).

$$\frac{N_s}{N_t} = \frac{x_s}{x_t} \quad (1.17)$$

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

Utilizando este procedimiento no se necesita recurrir a un calibrado metodológico para el cálculo de la relación de moles, entre compuesto natural y análogo enriquecido, ya que la relación de fracciones molares es igual a la relación de moles. Además, la probabilidad de efectos isotópicos disminuye mediante el uso de análogos enriquecidos mínimamente marcados en  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  o mediante el marcaje en un heteroátomo.

### 1.4.7.2 Efectos isotópicos y solapamiento espectral en dilución isotópica orgánica

A la hora de seleccionar el marcaje isotópico en el análogo enriquecido, cuando se quiere cuantificar un compuesto mediante análisis por dilución isotópica, se deben tener en cuenta una serie de consideraciones<sup>126</sup>:

- ✓ La marca isotópica, como regla general, debe ser estable durante todos y cada uno de los pasos de los que forma parte el procedimiento analítico seguido, es decir, sin que haya intercambios entre las abundancias isotópicas del trazador y el analito. Si el marcaje se lleva a cabo con  $^{13}\text{C}$  o  $^{15}\text{N}$ , los enlaces C-C y C-N se consideran estables durante el proceso analítico, sin que haya ruptura de los mismos. En cambio, en el caso de los isótopos  $^2\text{H}$  y  $^{18}\text{O}$ , se pueden observar intercambios en la marca e incluso pérdida de la misma durante las etapas analíticas requeridas.
- ✓ Otro factor a tener en cuenta es la facilidad para introducir la marca isotópica en la molécula, es decir, la posibilidad de llevar a cabo la síntesis del trazador o la disponibilidad comercial del trazador. Por ejemplo,  $^2\text{H}$  se incorpora de forma relativamente fácil a moléculas orgánicas en comparación con el  $^{13}\text{C}$ .

## 1. Introducción

---

- ✓ El número de isótopos utilizados para el marcaje es también un factor a tener en cuenta. En IDMS orgánica donde se lleva a cabo un calibrado metodológico se recomienda normalmente un mínimo de tres isótopos para evitar el solapamiento espectral y obtener gráficas de calibrado lineales. Sin embargo, cuando el número de isótopos empleados en el marcaje es elevado los efectos isotópicos pueden observarse, de una forma más acusada en el caso del deuterio, presentando incluso distinto tiempo de retención el trazador marcado con deuterio y el analito<sup>138</sup>.

Los *efectos isotópicos* se pueden definir como cambios en el comportamiento de las sustancias marcadas isotópicamente con respecto a las no marcadas. Estos cambios se deben a las pequeñas diferencias en las propiedades físico-químicas entre el analito presente en la muestra y el trazador, derivadas de la diferencia en masa entre ambos. Estos efectos observados son más pronunciados cuanto mayor es la diferencia de masa relativa entre el isótopo marcado y el no marcado. Por esta razón, es recomendable el uso de patrones marcados en elementos con pesos atómicos no demasiado bajos (C o N) o en caso de tener que recurrir a elementos que presenten una gran diferencia relativa en masa, entre los dos isótopos (como ocurre entre el hidrógeno  $^1\text{H}$  y deuterio  $^2\text{H}$ ), se recomienda utilizar trazadores que contengan el mínimo número de átomos marcados (marcaje mínimo), con el fin de minimizar estos efectos. Estos efectos suelen conllevar cambios en los tiempos de retención y diferentes recuperaciones entre las formas marcada y natural del analito<sup>139</sup>. Los cambios en los tiempos de retención se pueden deber a la diferencia de longitud entre los enlaces C-D y C-H, siendo el enlace C-D más fuerte que el C-H<sup>140,141</sup>.

El solapamiento espectral entre el analito o el análogo enriquecido se suele evitar cuando se utiliza la aproximación empírica basada en un calibrado metodológico, ya que se requiere el uso de ajustes polinomiales para establecer la dependencia entre la relación isotópica y la relación de moles. Por esta razón, la gran mayoría de metodologías analíticas que se han desarrollado para realizar la determinación de compuestos orgánicos mediante IDMS, utilizan análogos enriquecidos con múltiples átomos marcados, lo que simplifica el tratamiento de los datos pero, como se ha explicado anteriormente, puede dar lugar a efectos isotópicos entre el analito y el trazador.

La minimización de los efectos isotópicos en dilución isotópica orgánica pasa por utilizar análogos enriquecidos mínimamente marcados en  $^{13}\text{C}$  ó  $^{15}\text{N}$ . Esta estrategia denominada marcaje mínimo produce dos efectos importantes. En primer lugar se mejora la exactitud y precisión de las determinaciones, ya que se minimizan las diferencias entre las propiedades físico-químicas del analito y el trazador. En segundo lugar, se favorece el solapamiento espectral entre el compuesto de abundancia natural y el enriquecido, por lo que se complica el tratamiento de datos cuando se utiliza la aproximación empírica clásica basada en la construcción de un calibrado metodológico. Estos dos efectos producen, por tanto, una ventaja y un inconveniente resultando complicado encontrar las condiciones ideales para poder aplicar IDMS a la determinación de sustancias orgánicas.

### 1.4.7.3 Marcaje en el heteroátomo en análisis por dilución isotópica

Algunos compuestos orgánicos, además de contener los átomos de C, H, O y N donde se puede introducir la marca isotópica, presentan otros elementos (heteroátomos). La mayoría de estos elementos contienen un isótopo que presenta una baja abundancia isotópica natural, pudiendo ser empleados como marca isotópica. Este tipo de marcaje isotópico ha sido utilizado tradicionalmente dentro del campo del análisis de especiación. La mayoría de estas aplicaciones utilizan como fuente de ionización el plasma de acoplamiento inductivo (ICP), aunque algunas publicaciones hacen uso de la fuente de ionización electrónica (EI)<sup>142,143</sup>. En la mayoría de los casos, es necesario llevar a cabo una separación cromatográfica previa a la detección selectiva y sensible mediante ICP-MS. Cuando se realiza un análisis de especiación mediante IDMS específica, las diferentes especies químicas a determinar se encuentran marcadas isotópicamente mediante un isótopo enriquecido del elemento, y la determinación se lleva a cabo mediante la ecuación de la dilución isotópica elemental (ver ecuación (1.8)). Se pueden citar algunos ejemplos para este tipo de determinaciones, como son la determinación de Cr(III) y Cr(VI), compuestos de butilestaño o mercurio inorgánico y metilmercurio<sup>129,144</sup>. Recientemente, el marcaje en el heteroátomo utilizando isótopos estables enriquecidos ha sido empleado en la cuantificación de biomoléculas, en particular para la determinación absoluta de proteínas que contienen heteroátomo mediante ICP-MS<sup>145</sup>.

## 1. Introducción

---

Cuando una molécula orgánica contiene un heteroátomo, el concepto de marcaje en el heteroátomo puede ser llevado al campo de la IDMS orgánica. La idea que se persigue es que el heteroátomo empleado en el marcaje presente una diferencia de masa relativa entre sus isótopos más baja que la que presentan los átomos habituales en el marcaje isotópico como son C, H, O y N, minimizando de esta forma los posibles efectos isotópicos que se pueden experimentar durante el tratamiento de muestra y la propia determinación. Cabe destacar, como se ha explicado anteriormente, los acusados efectos isotópicos que se observan en el deuterio ( $^2\text{H}$ ), presentando incluso diferentes propiedades físico-químicas con respecto a la especie de abundancia isotópica natural. Cuando es probable que ocurran estos efectos isotópicos, se suele llevar a cabo un calibrado, preparado siguiendo exactamente el mismo procedimiento de preparación de muestra tanto para patrones como para muestras. Sin embargo, esta forma de proceder no es capaz de corregir los citados efectos isotópicos, ya que la propia matriz de la muestra puede afectar las separaciones químicas del proceso analítico, los tiempos de retención a lo largo de la cromatografía o incluso producir efectos de supresión en la fuente de ionización, particularmente en la fuente ESI.

La utilización de compuestos enriquecidos en un heteroátomo, aunque solapa con el campo de la especiación elemental, permite ampliar el campo de aplicación de la determinación de compuestos orgánicos. Un ejemplo de ello sería la determinación de los difenil éteres polibromados (PBDEs), los cuales tradicionalmente se determinan mediante IDMS utilizando los análogos enriquecidos en  $^{13}\text{C}_{12}$ -PBDEs. La utilización de las especies enriquecidas en  $^{13}\text{C}$  limita la elección de la fuente de ionización elegida, siendo la más utilizada la fuente EI. El marcaje en  $^{13}\text{C}$  impide la utilización de fuentes muy sensibles y selectivas como son la ionización química negativa (NCI) y la fuente ICP. La utilización de estas fuentes elementales, permite el uso de IDMS clásica con la utilización de la ecuación (1.8), para llevar a cabo la cuantificación de estos compuestos orgánicos mediante la medida de las relaciones isotópicas del heteroátomo. Con la síntesis de PBDEs enriquecidos<sup>146</sup> en  $^{81}\text{Br}$  se ha podido cuantificar utilizando PBDEs en tejido de pescado mediante GC-ICP-MS<sup>147</sup>, o en muestras de agua a niveles de ultratrazo por GC-NCI-MS<sup>148</sup>.

## BIBLIOGRAFÍA

- <sup>1</sup> K. Ballschmiter, M. Zell. **Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography.** Analytical Chemistry. (1980), 302, 20-31.
- <sup>2</sup> J. E. Gebhart, T. L. Hayes. **Mass spectrometric determination of polychlorinated biphenyls as isomer groups.** Analytical Chemistry. (1985), 57, 2458-2463.
- <sup>3</sup> K. Srogi. **Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in environmental and human samples: a review.** Environmental Chemistry Letters. (2008), 6, 1-28.
- <sup>4</sup> European Food Safety Authority (EFSA). **Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed.** EFSA Journal (2010), 8(7):1701 (35 páginas).
- <sup>5</sup> A. Filipkowska. **Determining PCBs in fish and sediment samples related to intercomparison studies.** Polish Journal of Environmental Studies. (2013), 5, 1341-1347.
- <sup>6</sup> M. Kim, S. Kim, S. Yun, M. Lee, B. Cho, J. Park, S. Son, O. Kim. **Comparison of seven indicator PCBs and three coplanar PCBs in beef, pork and chicken fat.** Chemosphere. (2004), 54, 1533-1538.
- <sup>7</sup> European Food Safety Authority (EFSA). **Scientific report of EFSA. Results of the monitoring of non dioxin-like PCBs in food and feed.** EFSA Journal. (2010), 8(7):1701.
- <sup>8</sup> UG. Ahlborg, GC. Becking, LS. Birnbaum, A. Brouwer, HJGM. Derks, M. Feeley, G. Golor, A. Hanberg, JC. Larsen, AKD. Liem, C. Schlatter, F. Waern. M. Younes, E. Yrjänheikki. **Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs.** Chemosphere. (1994), vol. 28, num 6, 1049-1067.
- <sup>9</sup> N. Li, F. Wania, Y. D. Lei, G. L. Daly. **A comprehensive and critical compilation, evaluation and selection of physical-chemical property data for selected polychlorinated biphenyls.** Journal of Physical Chemistry. (2003), vol 32, num 4, 1545- 1590.
- <sup>10</sup> Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). **Guía del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes.** (2003). [www.pops.int](http://www.pops.int)
- <sup>11</sup> Euro Chlor Risk Assessment for the Marine Environment OPARCOM region North Sea. **PCBs (polychlorinated biphenyls), DDT (Di (para-chloro-phenyl)-trichloroethane), Dioxins.** (2002).

- <sup>12</sup> Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. **Transformadores y condensadores con PCB: desde la gestión hasta la reclasificación y eliminación.** (2002).
- <sup>13</sup> K. Kannan, H. Nakata, R. Stafford, G. R. Masson, S. Tanabe, J. P. Giesy. **Bioaccumulation and toxic potential of extremely hydrophobic polychlorinated biphenyl congeners in biota collected at a superfund site contaminated with Aroclor 1268.** Environmental Science & Technology. (1998), 32, 1214, 1221.
- <sup>14</sup> D. A. Abramowicz. **Aerobic and anaerobic PCB biodegradation in the environment.** Environmental Health Perspectives. (1995), 103, 97-99.
- <sup>15</sup> J. Wiegel, Q. Wu. **Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls.** Minireview. FEMS Microbiology Ecology. (2000), 32, 1-15.
- <sup>16</sup> J. Borja, D. M. Taleon, J. Auresenia, S. Gallardo. **Polychlorinated biphenyls and their biodegradation.** Review Process Biochemistry. (2005), 40, 1999-2013.
- <sup>17</sup> Convenio de Basilea. Manual de capacitación. Preparación de un plan nacional de manejo ambientalmente adecuado de los bifenilos policlorados (PCB) y de equipos contaminados con PCB. (2003).
- <sup>18</sup> Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. (2001). Disponible en [www.pops.int/documents/convtext/convtext\\_en.pdf](http://www.pops.int/documents/convtext/convtext_en.pdf).
- <sup>19</sup> H. P. Tang. **Recent development in analysis of persistent organic pollutants under the Stockholm Convention.** Trends in Analytical Chemistry. (2013), 45, 48-66.
- <sup>20</sup> C. E. Bacon, W. M. Jarman, D. P. Costa. **Organochlorine and polychlorinated biphenyl levels in pinniped milk from the Arctic, the Antarctic, California and Australia.** Chemosphere (1992), vol 24, num 6, 779-791.
- <sup>21</sup> P. A. Pavlova, P. Schmid, C. Bogdal, C. Steinlin, T. M. Jenk, M. Schwikowski. **Polychlorinated biphenyls in Glaciers. 1. Deposition history from an Alpine ice core.** Environmental Science & Technology. (2014), 48, 7842-7848.
- <sup>22</sup> C. Steinlin, C. Bogdal, M. Scheringer, P. A. Pavlova, M. Schwikowski, P. Schmind, K. Hungerbühler. **Polychlorinated biphenyls in Glaciers. 2. Model results of deposition and incorporation processes.** Environmental Science & Technology. (2014), 48, 7849-7857.
- <sup>23</sup> S. D. Choi, S. Y. Baek, Y. S. Chang, F. Wania, M. G. Ikonomou, Y. J. Yoon, B. K. Park, S. Hong. **Passive air sampling of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides at the Korean Arctic and Antarctic research stations:**

**implications for long-range transport and local pollution.** Environmental Science & Technology. (2008), 42, 7125-7131.

<sup>24</sup> M. Vecchiato, E. Argiriadis, S. Zambon, C. Barbante, G. Toscano, A. Gambaro, R. Piazza. **Persistent Organic Pollutants (POPs) in Antrarctica: occurrence in continental and coastal surface snow.** Microchemical Journal. (2015), 119, 75-82.

<sup>25</sup> F. Wania and D. Mackay. **Tracking the distribution of Persistent Organic Pollutants.** Environmental Science & Technology. (1996), vol 30, num 9. 390-396.

<sup>26</sup> B. D. Rodan, D. W. Pennington, N. Eckley, R. S. Boethling. **Screening for Persistent Organic Pollutants: techniques to provide a scientific basis for POPs criteria in international negotiations.** Environmental Science & Technology. (1999), 33, 3482-3488.

<sup>27</sup> A. Bernard, F. Broeckaert, G. De Poorter, A. De Cock, C. Hermans, C. Saegerman, G. Hounis. **Belgian PCB/Dioxin incident: analysis of the food chain contamination and health risk evaluation.** Environmental Research. (2002), section A 88, 1-18.

<sup>28</sup> D. O. Carpenter. **Polychlorinated biphenyls (PCBs): routes of exposure and effects on human health.** Reviews on environmental health. (2006), vol 21, num 1.

<sup>29</sup> G. Ross. **The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment.** Ecotoxicology and Environmental Safety. (2004), 59, 275-291.

<sup>30</sup> K. Jaraczewska, J. Lulek, A. Covaci, S. Voorpoels, A. Kaluba-Skotarczak, K. Drews, P. Schepens. **Distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, maternal serum and milk from Wielkpolska region, Poland.** Science of the Total Environment. (2006), 372, 20-31.

<sup>31</sup> C. Mori, N. Nakamura, E. Todaka, T. Fujisaki, Y. Matsuno, H. Nakaoka, M. Hanazato. **Correlation between human maternal-fetal placental transfer and molecular weight of PCB and dioxin congeners/isomers.** Chemosphere. (2014), 114, 262-267.

<sup>32</sup> X. Xu, Y. M. Chiung, F. Lu, S. Qiu, M. Ji, X. Huo. **Associations of cadmium, bisphenol A and polychlorinated biphenyl co-exposure in utero with placental gene expression and neonatal outcomes.** Reproductive Toxicology. (2015), 52, 62-70.

<sup>33</sup> R. E. Ellsworth, K. A. Mamula, N. S. Costantino, B. Deyarmin, P. J. Kostyniak, L. H. Chi, C. D. Shriver, D. Ellsworth. **Abundance and distribution of polychlorinated biphenyls (PCBs) in breast tissue.** Environment research. (2015), 138, 291-297.

- <sup>34</sup> J. Annamalai, V. Namasivayam. **Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: their effects on humans and wildlife.** Environment International. (2015), 76, 78-97.
- <sup>35</sup> M. Alae, P. Arias, A. Sjödin, A. Bergman. **An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release.** Environment International. (2003), 29, 683-689.
- <sup>36</sup> L. S. Birnbaum, D. F. Staskal. **Brominated flame retardants: cause for concern?** Environmental Health Perspectives. (2004), vol 112, num 1, 9-17.
- <sup>37</sup> Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo. 226 (1-17).
- <sup>38</sup> N. V. Heeb, W. B. Schweizer, P. Mattrel, R. Haag, A. C. Gerecke, M. Kohler, P. Schmid, M. Zennegg, M. Wolfensberger. **Solid-state conformations and absolute configurations of (+) and (-)  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexabromocyclododecanes (HBCDs).** Chemosphere. (2007), 68, 940-950.
- <sup>39</sup> A. Covaci, A. C. Gerecke, R. J. Law, S. Voorspoels, M. Kohler, N. V. Heeb, H. Leslie, C. R. Allchin, J. De Boer. **Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans: A review.** Environmental Science and Technology. (2006), Vol 40, num 12, 3679-3688.
- <sup>40</sup> R. J. Law, M. Kohler, N. V. Heeb, A. C. Gerecke, P. Schmid, S. Voorspoels, A. Covaci, G. Becher, K. Janák, C. Thomsen. **Hexabromocyclododecane challenges scientists and regulators.** Environmental Science and Technology. (2005), 281-287.
- <sup>41</sup> G. T. Tomy, W. Budakowski, T. Halldorson, D. M. Whittle, M. J. Keir, C. Marvin, G. Macinnis, M. Alae. **Biomagnification of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Hexabromocyclododecane isomers in a Lake Ontario food web.** Environmental Science and Technology. (2004), 38, 2298-2303.
- <sup>42</sup> C. A. De Wit. **An overview of brominated flame retardants in the environment.** Chemosphere. (2002), 46, 583-624.
- <sup>43</sup> C. A. de Wit, M. Alae, D. C. G. Muir. **Levels and trends of brominated flame retardants in the Arctic.** Chemosphere. (2006), 64, 209-233.
- <sup>44</sup> C. A. De Wit, D. Herzke, K. Vorkamp. **Brominated flame retardants in the Arctic environment-trends and new candidates.** Science of Total Environment. (2010), 408, 2885-2918.

- <sup>45</sup> A. Covaci, S. Harrad, M. A. E. Abdallah, N. Ali, R. J. Law, D. Herzke, C. A. de Wit. **Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour.** Environment International. (2011), 37, 532-556.
- <sup>46</sup> G. J. Pierce, M. B. Santos, S. Murphy, J. A. Learmonth, A. F. Zuur, E. Rogan, P. Bustamante, F. Caurant, V. Lahaye, V. Ridoux, B. N. Zegers, A. Mets, M. Addink, C. Smeenk, T. Jauniaux, R. J. Law, W. Dabin, A. López, J. M. Alonso Farré, A. F. González, A. Guerra, M. García-Hartmann, R. J. Reid, C. F. Moffat, C. Lockyer, J. P. Boon. **Bioaccumulation of persistent organic pollutants in female common dolphins (*Delphinus delphis*) and harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from western European seas: Geographical trends, casual factors and effects on reproduction and mortality.** Environmental pollution. (2008), 153, 401-415.
- <sup>47</sup> R. J. Law, D. Herzke, S. Harrad, S. Morris, P. Bersuder, C. R. Allchin. **Levels and trends of HBCD and BDEs in the European and Asian environments, with some information for other BFRs.** Chemosphere. (2008), 73, 223-241.
- <sup>48</sup> S. Morris, P. Bersuder, C. R. Allchin, B. Zegers, J. P. Boon, P. E. G. Leonards, J. De Boer. **Determination of the brominated flame retardant, hexabromocyclododecane, in sediments and biota by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry.** Trends in Analytical Chemistry. (2006), Vol 25, num 4, 343-349.
- <sup>49</sup> A. Bernhoft, O. Wiig, J. U. Skaare. **Organochlorines in polar bears (*Ursus Maritimus*) at Svalbard.** Environmental Pollution. (1997), vol 95, num 2, 159-175.
- <sup>50</sup> R. J. Law, C. R. Allchin, J. De Boer, A. Covaci, D. Herzke, P. Lepom, S. Morris, J. Tronczynski, C. A. de Wit. **Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment.** Chemosphere. (2006), 64, 187-208.
- <sup>51</sup> K. Law, T. Halldorson, R. Danell, G. Stern, S. Gewurtz, M. Alae, C. Marvin, M. Whittle, G. Tomy. **Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a lake Winnipeg (Canada) food web.** Environmental Toxicology and Chemistry. (2006), vol 25, num 8, 2177-2186.
- <sup>52</sup> J. L. Lyche, C. Rosseland, G. Berge, A. Polder. **Human health risk associated with brominated flame-retardants (BFRs).** Review (2015), 74, 170-180.
- <sup>53</sup> P. O Darnerud. **Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife.** Environment International. (2003), 29, 841-853.

- <sup>54</sup> M. Ema, S. Fujii, M. Hirata-Koizumi, M. Matsumoto. **Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats.** *Reproductive Toxicology*. (2008), 25, 335-351.
- <sup>55</sup> L. T. M. Van der Ven, T. Van de Kuil, P. E. G. Leonards, W. Slob, H. Lilienthal, S. Litens, M. Herlin, H. Hakansson, R. F. Cantón, M. Van den Berg, T. J. Visser, H. Van Loveren, J. G. Vos, A. H. Piersma. **Endocrine effects of hexabromocyclododecane (HBCD) in a one-generation reproduction study in Wistar rats.** *Toxicology Letters*. (2009), 185, 51-62.
- <sup>56</sup> V. P. Palace, K. Pleskach, T. Halldorson, R. Danell, K. Wautier, B. Evans, M. Alae, C. Marvin, G. T. Tomy. **Biotransformation enzymes and thyroid axis disruption in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to hexabromocyclododecane diastereoisomers.** *Environmental Science and Technology*. (2008), 42, 1967-1972.
- <sup>57</sup> K. Law, T. Halldorson, R. Danell, G. Stern, S. Gewurtz, M. Alae, C. Marvin, M. Whittle, G. Tomy. **Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a Lake Winnipeg (Canada) food web.** *Environmental Toxicology and Chemistry*. (2006), Vol. 25, num. 8, 2177-2186).
- <sup>58</sup> T. Hamers, J. H. Kamstra, E. Sonneveld, A. J. Murk, M. H. A. Kester, P. L. Anderson, J. Legler, A. Brouwer. **In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants.** *Toxicological Sciences*. (2006), 92, 157, 173.
- <sup>59</sup> A. C. Dirtu, M. Abdallah, A. Covaci. **Advances in the sample preparation of brominated flame retardants and other brominated compounds.** *Trends in Analytical Chemistry*. (2013), 43, 189-203.
- <sup>60</sup> H. Po-on Tang. **Recent development in analysis of persistent organic pollutants under the Stockholm Convention.** *Trends in Analytical Chemistry*. (2013), 45, 48-66.
- <sup>61</sup> W. Xu, X. Wang, Z. Cai. **Analytical chemistry of the persistent organic pollutants identified in the Stockholm Convention: A review.** *Analytica Chimica Acta*. (2013), 790, 1-13.
- <sup>62</sup> K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, R. M. Smith. **Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in food.** *Review. Journal of Chromatography A*. (2007), 1153, 36-53.
- <sup>63</sup> O. Zuloaga, P. Navarro, E. Bizkarguenaga, A. Iparraguirre, A. Vallejo, M. Olivares, A. Prieto. **Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the**

**determination of organic pollutants in sewage sludge: A review.** *Analytical Chimica Acta.* (2012), 736, 7-29.

<sup>64</sup> Y. Abrha, D. Raghavan. **Polychlorinated biphenyl (PCB) recovery from spiked organic matrix using accelerated solvent extraction (ASE) and Soxhlet extraction.** *Journal of Hazardous Materials B.* (2000), 80, 147-157.

<sup>65</sup> P. Wang, Q. Zhang, Y. Wang, T. Wang, X. Li, L. Ding, G. Jiang. **Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples.** *Analytica Chimica Acta.* (2010), 663, 43-48.

<sup>66</sup> D. Zacs, J. Rjabova, A. Viksna, V. Bartkevics. **Method development for the simultaneous determination of polybrominated, polychlorinated, mixed polybrominated/chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in fish.** *Chemosphere.* (2015), 118, 72-80.

<sup>67</sup> P. Vazquez-Roig, Y. Picó. **Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples.** *Trends in Analytical Chemistry.* (2015), 71, 55-64.

<sup>68</sup> B. Subedi, L. Aguilar, E. M. Robinson, K. J. Hageman, E. Björklund, R. J. Sheesley, S. Usenko. **Selective pressurized liquid extraction as a sample-preparation technique for persistent organic pollutants and contaminants of emerging concern.** *Trends in Analytical Chemistry.* (2015), 68, 119-132.

<sup>69</sup> P. Suchan, J. Pulkrabová, J. Hajslová, V. Kocourek. **Pressurized liquid extraction in determination of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in fish samples.** *Analytica Chimica Acta A.* (2004), 520, 193-200.

<sup>70</sup> F. J. Camino-Sánchez, A. Zafra-Gómez, J. P. Pérez-Trujillo, J. E. Conde-González, J. C. Marques, J. L. Vílchez. **Validation of a GC-MS/MS method for simultaneous determination of 86 persistent organic pollutants in marine sediments by pressurized liquid extraction followed by stir bar sorptive extraction.** *Chemosphere.* (2011), 84, 869-881.

<sup>71</sup> E. M. Robinson, M. Jia, S. J. Trumble, S. Usenko. **Selective pressurized liquid extraction technique for halogenated organic pollutants in marine mammal blubber: A liquid-rich matrix.** *Journal of Chromatography A.* (2015), 1385, 111-115.

- <sup>72</sup> B. Subedi, L. Aguilar, E. M. Robinson, K. J. Hageman, E. Björklund, R. J. Sheesley, S. Usenko. **Selective pressurized liquid extraction as a sample-preparation technique for persistent organic pollutants and contaminants of emerging concern.** Trends in Analytical Chemistry. (2015), 68, 119-132.
- <sup>73</sup> T. S. Awad, H. A. Moharram, O. E. Shaltout, D. Asker, M. M. Youssef. **Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review.** Food Research International. (2012), 48, 410-427.
- <sup>74</sup> Y. Picó. **Ultrasound-assited extraction for food and environmental samples.** Trends in Analytical Chemistry. (2013), 43, 84-99.
- <sup>75</sup> F. Chemat, G. Cravotto (ed.). **Microwave assisted extraction for Bioactive compounds: theory and practice.** Food Engireerign Series 4. Springer Science+Business Media New York. (2013).
- <sup>76</sup> C.S. Eskilsson, E. Björklund. **Analytical-scale microwave-assisted extraction.** Journal of Chromatography A. Review. (2000), 227-250.
- <sup>77</sup> L. Sanchez-Prado, C. García-Jares, T. Dagnac, M. Llompart. **Microwave-assisted extraction of emerging pollutants in environmental and biological samples before chromatographic determination.** Trends in Analytical Chemistry. (2015), 71, 119-143.
- <sup>78</sup> J. Szpunar, V. O. Schmitt, O. F. X. Donard, R. Lobinski. **Low-power focused microwave technology as a new tool for rapid preparation of solid samples for speciation analysis.** Trends in Analytical Chemistry. (1996), vol. 15, num 4, 181-187.
- <sup>79</sup> J. A. Nóbrega, L. C. Trevizan, G. C. L. Araújo, A. R. A. Nogueira. **Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation.** Spectrochimica Acta Part B. Review. (2002), 57, 1855-1876.
- <sup>80</sup> J. Pacheco-Arjona, P. Rodríguez-González, M. Valiente, D. Barclay, O. F. X. Donard. **Application of a new focused microwave technology with species-specific isotope dilution analysis for the quantitative extraction of organometallic contaminants in solid environmetal matrices.** International Journal of Environmental Analytical Chemistry. (2008), vol 88, num 13, 923-932.
- <sup>81</sup> N. Fabregat-Cabello, P. Rodríguez-González, A. Castillo, J. Malherbe, A. F. Roig-Navarro, S. E. Long, J. I. García Alonso. **Fast and accurate procedure for the determination of Cr (VI) in solid samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry.** Environmental Science & Technology. (2012), 46, 12542-12549.

- <sup>82</sup> M. C. Hennion. **Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography.** Journal of Chromatography A. Review. (1999), 856, 3-54.
- <sup>83</sup> H. Prosen, L. Zupancic-Kralj. **Solid-phase microextraction.** Trends in Analytical Chemistry. (1999), vol 8, num 4, 272-282.
- <sup>84</sup> E. A. Souza-Silva, R. Jiang, A. Rodríguez-Lafuente, E. Gionfriddo, J. Pawliszyn. **A critical review of the state of the the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis.** Trends in Analytical Chemistry. (2015), 71, 224-235.
- <sup>85</sup> F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho. **Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review.** Spectrochimica Acta Part B. (2009), 64, 1-15.
- <sup>86</sup> M. A. Jeannot, A. Przyjazny, J. M. Kokosa. **Single drop microextraction-Development, applications and future trends.** Journal of Chromatography A. Review. (2010), 1217, 2326-2336.
- <sup>87</sup> D. Muir, E. Sverko. **Analytical methods for PCB and organochlorine pesticides in environmental monitoring and surveillance: a critical appraisal.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. Review. (2006), 386, 769-789.
- <sup>88</sup> T. Grzeskowiak, B. Czarczynska-Goslinska, A. Zgola-Grzeskowiak. **Current approaches in sample preparation for trace analysis of selected endocrine-disrupting compounds: Focus on polychlorinated biphenyls, alkylphenols, and parabens.** Trends in Analytical Chemistry. (2016), 75, 209-226.
- <sup>89</sup> F. J. Santos, M.T. Galceran. **The application of gas chromatography to environmental analysis.** Trends in Analytical Chemistry. (2002), 21, 672-685.
- <sup>90</sup> O. N. Zabelina, V.I. Saloutin, O. N. Chupakhin. **Analysis of Polychlorinated biphenyls mixtures by gas chromatography.** Journal of Analytical Chemistry. Review. (2010), vol 65, num 11, 1098-1108.
- <sup>91</sup> A. Covaci, S. Voorspoels, L. Ramos, H. Neels, R. Blust. **Recent developments in the analysis of brominated flame retardants and brominated natural compounds.** Journal of Chromatography A. Review. (2007), 1153, 145-171.
- <sup>92</sup> S. P. J. van Leeuwen, J. de Boer. **Advances in the gas chromatographic determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment.** Journal of Chromatography A. Review. (2008), 1186, 161-182.

- <sup>93</sup> G. M. Frame. **A collaborative study of 209 PCB congeners and 6 Aroclors on 20 different HRGC columns.** Fresenius Journal Analytical Chemistry. (1997), 357, 701-713.
- <sup>94</sup> E. Rogers, M. Petreas, J. S. Park, G. Zhao, M. J. Charles. **Evaluation of four capillary columns for the analysis of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in human serum for epidemiologic studies.** Journal of Chromatography B. (2004), 813, 269-285.
- <sup>95</sup> P. J. Marriott, P. Haglund, R. C. Y. Ong. **A review of environmental toxicant analysis by using multidimensional gas chromatography and comprehensive GC.** Clinica Chimica Acta. Review. (2003), 328, 1-19.
- <sup>96</sup> P. J. Marriott, S.T. Chin, B. Maikhunthod, H. G. Schmarr, S. Bieri. **Multidimensional gas chromatography.** Trends in Analytical Chemistry. (2012), 34, 1-21.
- <sup>97</sup> A. Krueve, R. Rebane, K. Kipper, M. L. Oldekop, H. Evard, K. Herodes, P. Ravio, I. Leito. **Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I.** Analytica Chimica Acta. Review. (2015), 29-44.
- <sup>98</sup> M. Gumustas, S. Kurbanoglu, B. Uslu, S. A. Ozkan. **UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters.** Chromatographia. Review. (2013), 76, 1365-1427.
- <sup>99</sup> S. Fekete, J. Schappler, J. L. Veuthey, D. Guillarme. **Current and future trends in UPLC.** Trends in Analytical Chemistry. (2014), 2-13.
- <sup>100</sup> J. W. Cochran, G. M. Frame. **Recent developments in the high-resolution gas chromatography of polychlorinated biphenyls.** Journal of Chromatography A. Review.(1999), 843, 323-368.
- <sup>101</sup> W. Tian, H. Qunhui, H. Fu, X. Pei, B. Zhao. **Immunoanalysis methods for the detection of dioxin and related chemicals.**Sensors. Review. (2012), 12, 16710-16731.
- <sup>102</sup> J. T. Watson, O. D. Sparkman. **Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentation, applications and strategies for data interpretation.** John Wiley & Sons Ltd., England. (2008).
- <sup>103</sup> A. G. Harrison. **Chemical ionization mass spectrometry.** CRC Press. 2<sup>nd</sup> Edition. (1992)
- <sup>104</sup> E. de Hoffmann, V. Stroobant. **Mass spectrometry. Principles and Applications.** Third Edition. Wiley, England. (2007).

- <sup>105</sup> M. Popp, S.Hann, G.Koellensperger. **Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry-A review.** *Analytica Chimica Acta.* (2010), 668, 114-129.
- <sup>106</sup> B. Bouyssiére, J. Szpunar, R. Lobinski. **Gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection in speciation analysis.** *Spectrochimica Acta Part B.* (2002), 57, 805-828.
- <sup>107</sup> P. A. Mello, J. S. Barin, F. A. Duarte, C. A. Bizzi, L. O. Diehl, E. I. Muller, E. M. M. Flores. **Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* (2013), 405, 7615-7642.
- <sup>108</sup> D. Pröfrock, P. Leonhard, S. Wilbur, A. Prange. **Sensitive, simultaneous determination of P, S, Cl, Br and I containing pesticides in environmental samples by GC hyphenated with collision-cell ICP-MS.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* (2004), 19, 623-631.
- <sup>109</sup> P. Richner, S. Wunderli. **Differentiation between organic and inorganic chlorine by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry: application to the determination of polychlorinated biphenyls in waste oil.** *Journal of Analytical Atomic Spectrometry.* (1993), 8, 45-49.
- <sup>110</sup> T. Reemtsma. **Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants.** *Journal of Chromatography A. Review.* (2003), 1000, 477-501.
- <sup>111</sup> H. Hayen, U. Karst. **Strategies for the liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of non-polar compounds.** *Journal of Chromatography A. Review.* 1000, 549-565.
- <sup>112</sup> R. Kostianen, T. J. Kauppila. **Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A. Review.* (2009), 1216, 685-699.
- <sup>113</sup> P. J. Taylor. **Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry.** *Clinical Biochemistry. Review.* (2005), 38, 328-334.
- <sup>114</sup> F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M. C. Gennaro. **Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography. Review.* (2010), 1217, 3929-3937.

- <sup>115</sup> E. Rosenberg. **The potential of organic (electrospray-and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis.** Journal of Chromatography A. Review. (2003), 1000, 841-889.
- <sup>116</sup> I. Marchi, S. Rudaz, J. L. Veuthey. **Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography mass spectrometry: A review.** Talanta. Review. (2009), 78, 1-18.
- <sup>117</sup> R. Ekman, J. Silberring, A. M. Westman-Brinkmalm, A. Kraj. **Mass Spectrometry. Instrumentation, interpretation and applications.** Wiley-Interscience series on mass spectrometry. 2009.
- <sup>118</sup> J. Meija, T. B. Coplen, M. Berglund, W. A. Brand, P. De Bièvre, M. Gröning, N. E. Holden, J. Irrgeher, R. D. Loss, T. Walczyk, T. Prohaska. **Isotopic compositions of the elements 2013 (IUPAC Technical Report).** Pure Applied Chemistry. (2016), vol 88, num 3, 293-306.
- <sup>119</sup> C. G. J. Petersen. **The yearly immigration of young plaice into the Limfjord from the German Sea.** Report of the Danish Biological Station 6. (1895), 5.
- <sup>120</sup> C. Rosenblum. **Principles of Isotope Dilution Assays.** Analytical Chemistry. (1957), vol 29, num 12, 1740-1744.
- <sup>121</sup> D. Rittenberg, G. L. Foster. **A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids.** Journal of Biological Chemistry. (1940), 133, 737-744.
- <sup>122</sup> R. Schoenheimer, D. Rittenberg. **Studies in protein metabolism: I. General considerations in the application of isotopes to the study of protein metabolism. The normal abundances of nitrogen isotopes in amino acids.** Journal of Biological Chemistry. (1939), 127, 285-290.
- <sup>123</sup> **International Organization for Standardization, International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, 2,** Geneva, Switzerland:ISO. (1993).
- <sup>124</sup> H. Kubinyi. **Calculation of isotope distributions in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problema.** Analytica Chimica Acta. (1991), 247, 107-119.
- <sup>125</sup> J. Ignacio García Alonso, P. Rodríguez-González, A. González-Gago, A. González-Antuña. **Determination of the uncertainties in the theoretical mass isotopomer distribution of molecules.** Analytica Chimica Acta. (2010), 664, 68-76.

- <sup>126</sup> J. Ignacio García Alonso, P. Rodríguez González. **Isotope Dilution Mass Spectrometry**. Royal Society of Chemistry, Cambridge. (2013).
- <sup>127</sup> 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. (1989), 4, 761.
- <sup>128</sup> L. Rottmann, K. G. Heumann. **Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC-ICP-MS for accurate determination of elemental species**. Fresenius Journal of Analytical Chemistry. (1994), 350, 221.
- <sup>129</sup> P. Rodríguez-González, J. Ignacio García Alonso. **Recent advances in isotope dilution analysis for elemental speciation**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. (2010), 25, 239.
- <sup>130</sup> J. Ruiz Encinar, P. Rodríguez Gonzalez, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Evaluation of extraction techniques for the determination of butyltin compounds in sediments using Isotope Dilution-GC/ICP with <sup>118</sup>Sn and <sup>119</sup>Sn-enriched species**. Analytical Chemistry. (2002), 74, 270-281.
- <sup>131</sup> P. Rodríguez-González, M. Monperrus, J. I. García Alonso, D. Amouroux, O. F. X. Donard. **Comparison of different numerical approaches for multiple spiking species-specific isotope dilution analysis exemplified by the determination of butyltin species in sediments**. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. (2007), 22, 1373-1382.
- <sup>132</sup> H. Hintelmann, R. Falter, G. Ilgen, R. D. Evans. **Determination of artifactual formation of monomethylmercury (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) in environmental samples using stable Hg<sup>2+</sup> isotopes with ICP-MS detection: Calculation of contents applying species specific isotope addition**. Fresenius Journal of Analytical Chemistry. (1997), 358, 363-370.
- <sup>133</sup> A. Castillo, P. Rodríguez-González, G. Centineo, A. F. Roig-Navarro, J. I. García Alonso. **Multiple spiking species-specific Isotope Dilution Analysis by molecular Mass Spectrometry: Simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues**. Analytical Chemistry. (2010), 2773-2783.
- <sup>134</sup> S. Clémens, M. Monperrus, O. F. X. Donard, D. Amouroux, T. Guérin. **Mercury speciation in seafood using isotope dilution analysis: A review**. Talanta. (2012), 89, 12-20.

- <sup>135</sup> H. M. Kingston, D. Huo, Y. Lu, S. Chalk. **Accuracy in species analysis: speciated isotope dilution mass spectrometry (SIDMS) exemplified by the evaluation of chromium species.** *Spectromchimica Acta Part B.* (1998), 53, 299-309.
- <sup>136</sup> D. Huo, H. M. Kingston. **Correction of species transformations in the analysis of Cr (VI) in solid environmental samples using speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry.** *Analytical Chemistry.* (2000), 72, 5047-5054.
- <sup>137</sup> J. F. Pickup, K. McPherson. **Theoretical considerations in stable isotope dilution spectrometry for organic analysis.** *Analytical chemistry.* (1976), vol. 48, num 13, 1885-1890.
- <sup>138</sup> A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, I. Lavandera, G. Centineo, V. Gotor, J. I. García Alonso. **Development of a routine method for the simultaneous confirmation and determination of clenbuterol in urine by minimal labeling isotope pattern deconvolution and GC-EI-MS.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* (2012), 402, 1879-1888.
- <sup>139</sup> J. Wieling. **LC-MS-MS Experiences with Internal Standards.** *Chromatographia Supplement.* (2002), 55, 107-113.
- <sup>140</sup> E. Stokvis, H. Rosing, J. H. Beijnen. **Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not?.** *Rapid communications in mass spectrometry.* (2005), 19, 401-407.
- <sup>141</sup> N. Itoh, M. Numata, Y. Aoyagi, T. Yarita. **Comparison of the behavior of <sup>13</sup>C- and deuterium-labeled polycyclic aromatic hydrocarbons in analyses by isotope dilution mass spectrometry in combination with pressurized liquid extraction.** *Journal of Chromatography A.* (2007), 1138, 26-31.
- <sup>142</sup> C. Bancon-Montigny, P. Maxwell, L. Yang, Z. Mester, R. E. Sturgeon. **Improvement of measurement precision of SPME-GC/MS determination of tributyltin using isotope dilution calibration.** *Analytical Chemistry.* (2002), 74, 5606-5613.
- <sup>143</sup> G. Centineo, P. Rodríguez-González, E. Blanco González, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Simultaneous determination of mono-, di- and tributyltin in environmental samples using isotope dilution gas chromatography mass spectrometry.** *Journal of Mass Spectrometry.* (2004), 39, 485-494.

- <sup>144</sup> P. Rodríguez-González, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García Alonso, A. Sanz-Medel. **Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review.** Spectrochimica Acta Part B. Review. (2005), 60, 151-207.
- <sup>145</sup> J. Bettmer. **Application of isotope dilution ICP-MS techniques to quantitative proteomics.** Analytical and Bioanalytical Chemistry. (2010), 397, 3495-3502.
- <sup>146</sup> A. González-Gago, J. M. Marchante-Gayón, M. Ferrero, J. I. García Alonso. **Synthesis of <sup>81</sup>Br-labeled polybrominated diphenyl ethers and their characterization using GC(EI)MS and GC(ICP)MS.** Analytical Chemistry. (2010), 82, 2879-2887.
- <sup>147</sup> A. González-Gago, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García Alonso. **Determination of priority polybrominated diphenyl ethers by Isotope Dilution Gas Chromatography (Electron Ionization)MS using <sup>81</sup>Br-labeled standards.** Analytical Chemistry. (2011), 83, 3024-3032.
- <sup>148</sup> A. González-Gago, S. H. Brandsma, P. E. G. Leonards, J. de Boer, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García Alonso. **Determination of ultra-trace levels of priority PBDEs in water samples by isotope dilution GC(ECNI)MS using <sup>81</sup>Br-labelled standards.** Analytical Chemistry. (2011), 401, 2639-2649.



## **2. Objetivos**

---

---

---



### 2. OBJETIVOS

Como se ha comentado en la introducción, cuando se quiere desarrollar una metodología de cuantificación de compuestos orgánicos mediante IDMS, el marcaje isotópico en los heteroátomos proporciona dos ventajas fundamentales respecto al marcaje isotópico clásico en C, O, H o N. En primer lugar la diferencia de masa relativa entre los compuestos de abundancia isotópica natural y sus análogos enriquecidos es menor, por lo que se minimizan los posibles efectos isotópicos que pueden ocurrir a lo largo del proceso de preparación de muestra o incluso durante la separación cromatográfica. En segundo lugar, el marcaje en el heteroátomo de un compuesto orgánico permite utilizar, aparte de las fuentes de ionización moleculares como EI, ESI o APCI, otras fuentes de ionización como la fuente ICP o la NCI. De este modo se pueden cuantificar compuestos orgánicos, no solo mediante regresión lineal múltiple, sino también a partir de la medida de la relación isotópica del heteroátomo, aplicando la ecuación de la dilución isotópica clásica (ecuación (1.8)) para realizar la cuantificación del compuesto sin necesidad de realizar un calibrado metodológico.

Teniendo en cuenta estas consideraciones previas, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de contaminantes orgánicos halogenados mediante dilución isotópica y espectrometría de masas. Dichas metodologías se basarán en la utilización de análogos marcados isotópicamente en los halógenos de la molécula para realizar una cuantificación sin necesidad de recurrir a calibrados metodológicos. Gracias al marcaje en el heteroátomo se emplearán distintos tipos de espectrómetros de masas con los que se pretende medir la distribución isotópica de los compuestos de una manera exacta y precisa.

Con la finalidad de alcanzar este objetivo general, se abordaron los siguientes objetivos parciales durante la realización de la presente Tesis Doctoral:

**1. Determinación de bifenilos policlorados (PCBs) en muestras sólidas mediante dilución isotópica y espectrometría de masas utilizando análogos enriquecidos en <sup>37</sup>Cl.** Este objetivo se desarrolló a partir de los siguientes puntos:

- Síntesis y caracterización, tanto en enriquecimiento isotópico como en concentración de una mezcla de 12 congéneres prioritarios de PCBs enriquecidos en <sup>37</sup>Cl.

- Puesta a punto y validación de una metodología analítica para la cuantificación de PCBs en muestras sólidas, mediante IDMS utilizando microondas focalizadas como sistema de extracción y GC-EI-MS/MS en modo SRM como equipo de medida.
- Comparativa entre la metodología IDMS propuesta basada en el uso de PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  y una metodología IDMS clásica basada en el uso de PCBs enriquecidos en  $^{13}\text{C}$ , que conlleva la construcción de un calibrado metodológico.

**2. Desarrollo de métodos para la evaluación de la exactitud de distintos espectrómetros de masas utilizando compuestos orgánicos halogenados.** Este objetivo se desarrolló a partir de los siguientes puntos:

- Desarrollo de un procedimiento para analizadores de masas de cuadrupolo sencillo mediante la medida de las relaciones  $M+2/M$ ,  $M+4/M+2$ , etc, en compuestos orgánicos halogenados.
- Desarrollo de un procedimiento para analizadores de masas en tándem mediante la medida de las relaciones de las abundancias en los iones fragmento utilizando compuestos orgánicos halogenados.

**3. Comparación de diferentes espectrómetros de masas para la determinación de bifenilos policlorados(PCBs) mediante dilución isotópica utilizando análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ .** Este objetivo se desarrolló a partir de los siguientes puntos:

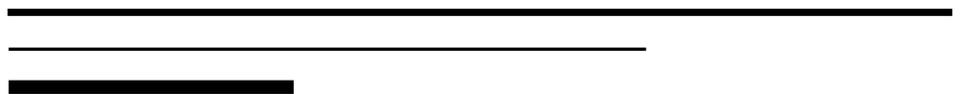
- Evaluación de la exactitud y precisión de los sistemas GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS y GC-NCI-MS para medir relaciones isotópicas de Cl en congéneres de PCBs.
- Comparación de las características analíticas obtenidas en la determinación de PCBs en muestras sólidas con distintos espectrómetros de masas acoplados a la cromatografía de gases: GC-EI-MS/MS, GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS y GC-NCI-MS.

**4. Determinación simultánea de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del Hexabromociclododecano (HBCD) en muestras de agua mediante dilución isotópica y espectrometría de masas utilizando análogos enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$ .** Este objetivo se desarrolló a partir de los siguientes puntos:

- Síntesis y purificación de los diastereoisómeros  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HBCD enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$ , y caracterización tanto en enriquecimiento isotópico como en concentración.
- Puesta a punto de una metodología analítica para la determinación de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HBCD en muestras de agua mediante LC-ESI-MS/MS en modo SRM.



# **3. Experimental**





### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1 Condiciones instrumentales

##### 3.1.1 Condiciones para la purificación de los PCBs enriquecidos en $^{37}\text{Cl}$ mediante cromatografía de líquidos semipreparativa

La cromatografía de líquidos semipreparativa se utilizó para el aislamiento y purificación de los distintos congéneres de PCBs enriquecidos isotópicamente de las dos mezclas obtenidas. Este sistema HPLC posee un detector UV-VIS, y un colector de fracciones automatizado. En la Tabla 3.1 se pueden observar las condiciones instrumentales empleadas en este equipo.

*Tabla 3.1 Condiciones instrumentales del HPLC semipreparativo empleado en la purificación de los PCBs sintetizados enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ .*

<b>Cromatógrafo</b>	Agilent 1260 Infinity
<b>Columna</b>	Zorbax Eclipse XDB-18C (9,4 mm, 250 mm, 5 $\mu\text{m}$ )
<b>Flujo de fase móvil</b>	2,5 mL $\text{min}^{-1}$
<b>Longitud de onda (lámpara UV)</b>	254 nm
<b>Volumen de inyección</b>	100 $\mu\text{L}$

##### 3.1.2 Condiciones experimentales empleadas en la determinación de PCBs mediante GC-EI-MS/MS, GC-NCI-MS, GC-ICP-MS y GC-ICP-MS/MS

En la Tabla 3.2 se muestran las condiciones experimentales empleadas en la determinación de PCBs mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas en tándem utilizando una fuente de Ionización Electrónica. Se empleó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo en el modo de adquisición SRM (Selected Reaction Monitoring).

*Tabla 3.2 Condiciones instrumentales para la medida de PCBs en el equipo GC-EI-MS/MS.*

<b>Parámetros cromatográficos</b>	
<b>Cromatógrafo</b>	7890A Agilent Technologies

<b>Columna</b>	DB-5MS (30 m x 0,25 mm i.d. x 250 $\mu$ m)	
<b>Gas portador</b>	He (2 mL min <sup>-1</sup> )	
<b>Modo de inyección</b>	Splitless (2 min de tiempo de purga)	
<b>Temperatura del inyector</b>	280°C	
<b>Programa de temperatura del horno cromatográfico</b>	Desde 80°C (1min) 220°C (0 min) a 20°C min <sup>-1</sup> 232°C (0 min) a 5°C min <sup>-1</sup> 300°C (3 min) a 30°Cmin <sup>-1</sup>	
<b>Temperatura de la interfase</b>	280°C	
<b>Parámetros de la fuente de ionización</b>		
<b>Detector</b>	Agilent 7000	
<b>Corriente de ionización</b>	35 $\mu$ A	
<b>Energía de ionización</b>	70 eV	
<b>Temperatura de la fuente</b>	230°C	
<b>Parámetros del detector</b>		
<b>Tiempo de integración</b>	100 ms	
<b>Modo de adquisición</b>	SRM	
<b>Transiciones SRM</b>	Tri (3Cl)	256 $\rightarrow$ 186 262 $\rightarrow$ 188
	Tetra (4Cl)	289,9 $\rightarrow$ 220 297,9 $\rightarrow$ 224
	Penta (5Cl)	323,9 $\rightarrow$ 253,9 333,9 $\rightarrow$ 260
	Hexa (6Cl)	357,8 $\rightarrow$ 287,9 369,8 $\rightarrow$ 296
	Hepta (7Cl)	391,8 $\rightarrow$ 321,9 405,8 $\rightarrow$ 331,9
	Octa (8Cl)	425,8 $\rightarrow$ 355,8 441,8 $\rightarrow$ 367,9

Con la utilización de los PCBs enriquecidos en <sup>37</sup>Cl se han podido utilizar fuentes de ionización elementales a la hora de llevar a cabo la cuantificación de los mismos. En la Tabla 3.3 se muestran las condiciones instrumentales de medida en los equipos GC-ICP-MS (cuadrupolo sencillo) y GC-ICP-MS/MS (triple cuadrupolo) utilizados a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

**Tabla 3.3** Condiciones instrumentales para la determinación de PCBs en los equipos GC-ICP-MS y GC-ICP-MS/MS.

Parámetros cromatográficos		
Modelo	Agilent 6890	
Columna	DB-5MS (15 m, 0,25 mm, 0,1 $\mu$ m)	
Modo de inyección	Cool On-column	
Volumen de inyección	1 $\mu$ L	
Flujo de gas portador	2,6 mL min <sup>-1</sup> (He)	
Temperatura de inyección	280°C	
Programa de temperatura	100°C(2min); 30°C min <sup>-1</sup> hasta 195°C(0 min); 5°C min <sup>-1</sup> hasta 210°C(0 min); 30°C min <sup>-1</sup> hasta 300°C(8,83 min)	
Temperatura de la interfase	300°C	
Parámetros del Espectrómetro de Masas		
	GC-ICP-MS	GC-ICP-MS/MS
Modelo	Agilent 7700	Agilent 8800
Potencia de Rf	900	800
Flujo del gas portador	0,95 L min <sup>-1</sup>	0,95 L min <sup>-1</sup>
Presión del gas auxiliar	30 Psi (N <sub>2</sub> )	30 Psi (N <sub>2</sub> )
Flujo del gas de colisión	2 mL min <sup>-1</sup> (He)	
Flujo del gas de reacción		2 mL min <sup>-1</sup> (H <sub>2</sub> )
m/z medidas	35 y 37	35→37; 37→39

De la misma forma a como ocurre para la fuente ICP, la fuente NCI puede ser utilizada para la determinación de PCBs mediante IDMS utilizando análogos enriquecidos en <sup>37</sup>Cl, ya que la marca isotópica se encuentra en el heteroátomo. En la Tabla 3.4 se presentan las condiciones utilizadas en el equipo GC-NCI-MS.

**Tabla 3.4** Condiciones instrumentales para la determinación de PCBs en el equipo GC-NCI-MS.

Parámetros cromatográficos	
Modelo	Shimadzu QP2010 Plus
Columna	DB-5MS (30m, 0,25mm, 0,25 $\mu$ m)
Modo de inyección	Splitless
Tiempo de muestra	0,50 min
Volumen de inyección	2 $\mu$ L
Flujo del gas portador	2 mL min <sup>-1</sup> (He)
Temperatura de inyección	280°C
Programa de temperaturas	80°C(1min); 20°C min <sup>-1</sup> hasta 220°C(0min); 5°C min <sup>-1</sup> hasta 232°C(0min); 30°C min <sup>-1</sup> hasta

	300°C(3 min)
Temperatura de la interfase	280°C
<b>Parámetros del espectrómetro de masas</b>	
Temperatura de la fuente	230°C
Voltage de la fuente	70 eV
Corriente de emisión	150 $\mu$ A
Gas reactivo	CH <sub>4</sub>
Tiempo comienzo de adquisición	4 min
Modo de adquisición	SIM
m/z medidas	35 y 37

### 3.1.3 Condiciones experimentales para la determinación de los diastereoisómeros $\alpha$ , $\beta$ , y $\gamma$ del HBCD mediante LC-ESI-MS/MS

En la Tabla 3.5 se muestran las condiciones instrumentales utilizadas para la determinación de los diastereoisómeros del HBCD mediante IDMS utilizando análogos enriquecidos en <sup>81</sup>Br y LC-MS/MS con fuente de ionización de electrospray.

*Tabla 3.5 Condiciones instrumentales para la determinación de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD mediante LC-ESI-MS/MS.*

<b>Parámetros cromatográficos</b>	
Modelo	Agilent 1290
Columna	Zorbax Eclipse Plus C18 (50 mm, 2,1 mm, 1,8 $\mu$ m)
Modo de trabajo	Isocrático
Volumen de inyección	20 $\mu$ L
Flujo de la fase móvil	0,4 mL min <sup>-1</sup>
Temperatura de la columna	40°C
Composición de la fase móvil	25% Fase A (agua ultrapura con 10 mM de acetato amónico) 75% Fase B (mezcla 80:20 MeOH:ACN)
<b>Parámetros del espectrómetro de masas</b>	
Modelo	Agilent 6460
Fuente de ionización/Modo	ESI (Jet Stream)/Modo negativo
Voltage del capilar	4000 V
Velocidad de flujo del gas de secado	6 mL min <sup>-1</sup>
Temperatura del gas de secado	300°C
Presión del nebulizador	45 Psi
Flujo y T del gas auxiliar "sheath gas"	11 mL min <sup>-1</sup> / 400°C

<b>Modo de adquisición</b>	SRM
<b>Tiempo de adquisición</b>	200 ms
<b>Voltage del “fragmentor”</b>	60 V
<b>Energía de colisión</b>	14 V
<b>Transiciones SRM</b>	638,6 → 78,9 646,6 → 80,9

### 3.1.4 Condiciones experimentales para la evaluación de la exactitud espectral mediante GC-EI-MS y GC-EI-MS/MS

La medida de la composición isotópica de PCBs y bifenil éteres polibromados (PBDEs) se utilizó para evaluar la exactitud espectral en modo de adquisición SIM (cuadrupolo simple) y en modo SRM (triple cuadrupolo) con el uso de la fuente de ionización electrónica (EI), bajo las condiciones experimentales que se muestran a continuación.

*Tabla 3.6 Condiciones experimentales para la evaluación de la exactitud espectral en la medida de la composición isotópica de PCBs y PBDEs.*

<b>Parámetros cromatográficos</b>			
	<b>PCBs</b>		<b>PBDEs</b>
<b>Columna</b>	DB-5MS (30m, 0.25mm, 0.25 µm)	<b>Columna</b>	DB-5MS (30m, 0.25mm, 0.25 µm)
<b>Modo de inyección</b>	Splitless	<b>Modo de inyección</b>	Splitless
<b>Volumen inyectado</b>	2 µL	<b>Volumen inyectado</b>	2 µL
<b>Gas portador/Flujo</b>	He/ 2 mL min <sup>-1</sup>	<b>Gas portador/Flujo</b>	He/ 2 mL min <sup>-1</sup>
<b>Temperatura del inyector</b>	280°C	<b>Temperatura del inyector</b>	300°C
<b>Programa de temperaturas</b>	80°C(1min) 20°C min <sup>-1</sup> hasta 220°C(0min) 5°C min <sup>-1</sup> hasta 232°C(0min) 30°C min <sup>-1</sup> hasta 300°C(3 min)	<b>Programa de temperaturas</b>	120°C(1min) 30°C min <sup>-1</sup> hasta 300°C(5min)
<b>Temperatura de la interfase</b>	280°C	<b>Temperatura de la interfase</b>	300°C
<b>Parámetros del espectrómetro de masas</b>			
<b>Temperatura de la fuente</b>	230°C	<b>Temperatura de la fuente</b>	230°C
<b>Energía de ionización</b>	70 eV	<b>Energía de ionización</b>	70 eV
<b>Temperatura del</b>	150°C	<b>Temperatura</b>	150°C

### 3. Experimental

cuadrupolo			del cuadrupolo		
Gas de colisión/Flujo	He/ 2.25 mL min <sup>-1</sup> N <sub>2</sub> / 1.5 mL min <sup>-1</sup>		Gas de colisión/Flujo	He/ 2.25 mL min <sup>-1</sup> N <sub>2</sub> / 1.5 mL min <sup>-1</sup>	
“Solvent delay”	6.5 min		“Solvent delay”	5.4 min	
Tiempo de integración	10 ms		Tiempo de integración	50 ms	
Modo de adquisición	SIM/SRM		Modo de adquisición	SIM/SRM	
<b>SIM</b>	Tri	256-262	<b>SIM</b>	Tri	402,8-411,8
	Tetra	289,9-296,9		Tetra	481,7-490,7
	Penta	323,9-331,9		Penta	561,6-570,6
	Hexa	357,8-366,8		Hexa	643,5-652,5
	Hepta	391,8-401,8			
	Octa	425,8-435,8			
<b>SRM</b>	Tri	258 → 186;188 260 → 186;188	<b>SRM</b>	Tri	405,8 → 245,9;247,9 407,8 → 245,9;247,9
	Tetra	291,9 → 219,9;221,9 293,9 → 219,9;221,9;223,9 295,9 → 221,9;223,9		Tetra	438,7 → 323,8;325,8 485,7 → 323,8;325,8;327,8 487,7 → 325,8;327,8
	Penta	325,9 → 253,9;255,9 327,9 → 253,9;255,9;257,9 329,9 → 255,9;257,9;259,9 331,9 → 257,9;259,9		Penta	561,6 → 401,7;403,7 563,6 → 401,7;403,7;405,7 565,6 → 403,7;405,7;407,7 567,6 → 405,7;407,7
	Hexa	359,8 → 287,9;289,9 361,8 → 287,9;289,9;291,9 363,8 → 289,9;291,9;293,9 365,8 → 291,9;293,9;295,9 367,8 → 293,9;295,9		Hexa	639,5 → 479,7;481,7 641,5 → 479,7;481,7;483,7 643,5 → 481,7;483,7;485,7 645,5 → 483,7;485,7;487,7 647,5 → 485,7;487,7
	Hepta	393,8 → 321,9;323,9 395,8 → 321,9;323,9;325,9 397,8 → 323,9;325,9;327,9 399,8 → 325,9;327,9;329,9 401,8 → 327,9;329,9;331,9 403,8 → 329,9;331,9		Hepta	717,4 → 557,6;559,6 719,4 → 557,6;559,6;561,6 721,4 → 559,6;561,6;563,6 723,4 → 561,6;563,6;565,6 725,4 → 563,6;565,6;567,6 727,4 → 565,6;567,6
	Octa	427,8 → 355,9;357,9 429,8 → 355,9;357,9;359,9 431,8 → 357,9;359,9;361,9 433,8 → 359,9;361,9;363,9 435,8 → 361,9;363,9;365,9			

## 3.2 Procedimientos experimentales

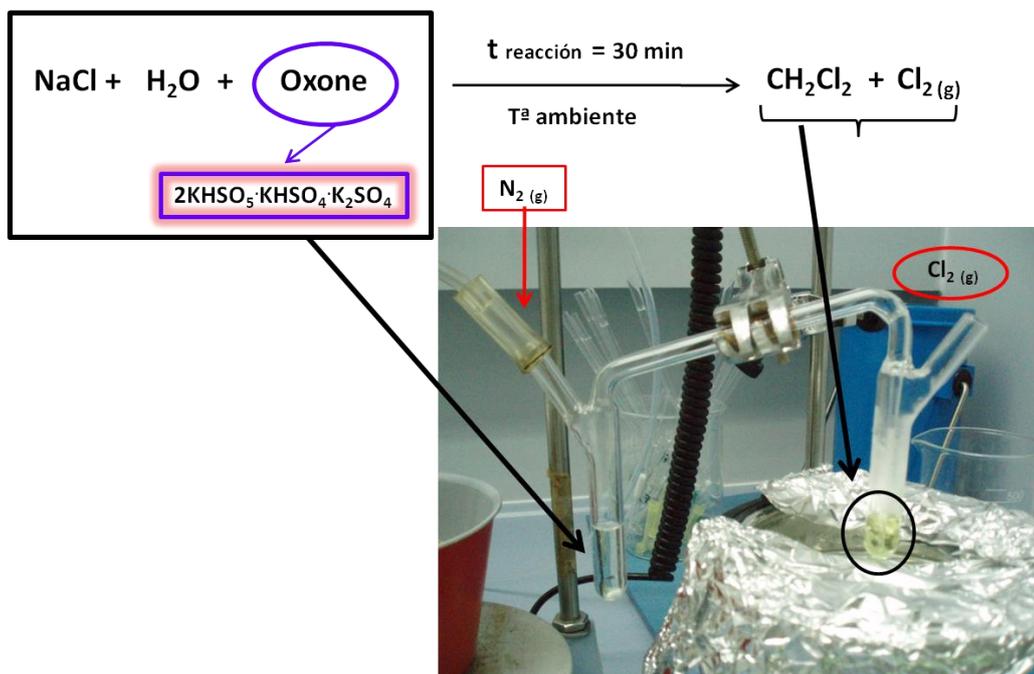
### 3.2.1 Síntesis y purificación de los congéneres de PCBs enriquecidos isotópicamente en $^{37}\text{Cl}$

Uno de los objetivos principales de la presente Tesis Doctoral ha sido la síntesis y posterior purificación de los PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  para su posterior uso como trazador isotópico a la hora de cuantificar mediante IDMS. En este apartado se describe el proceso optimizado para llevar a cabo dicha síntesis. Debido a la complejidad de los procedimientos de síntesis y purificación, gran parte de las optimizaciones previas se describirán en la discusión integradora de los resultados. El procedimiento final optimizado para la síntesis se dividió en dos partes. Por un lado, una primera reacción cuya finalidad es la producción de  $\text{Cl}_{2(\text{g})}$  enriquecido en  $^{37}\text{Cl}$ , y a continuación la adición electrófila del  $^{37}\text{Cl}_{(\text{g})}$  al anillo aromático del bifenilo.

#### 3.2.1.1 Formación de $\text{Cl}_{2(\text{g})}$ enriquecido en $^{37}\text{Cl}$

Para llevar a cabo esta reacción de oxidación en medio acuoso se diseñó un sistema de vidrio específico. En la Figura 3.1 se puede observar una fotografía del sistema de vidrio empleado donde puede verse que consta de dos reservorios. En el reservorio de la izquierda se depositan 2 g de agua ultra-pura, 50 mg de cloruro sódico enriquecido isotópicamente ( $\text{Na}^{37}\text{Cl}$ ) y 540 mg del agente oxidante Oxone® (sal triple de fórmula  $2\text{KHSO}_5 \cdot \text{KHSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$ ). Esta mezcla se agita mediante agitación magnética a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min. A los pocos minutos de agitación comienza a observarse en el reservorio un burbujeo debido a la formación de  $\text{Cl}_{2(\text{g})}$  que se produce por la oxidación de Cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) a  $\text{Cl}_{2(\text{g})}$ . Este primer reservorio se encuentra conectado a una toma de  $\text{N}_{2(\text{g})}$ , capaz de arrastrar el  $^{37}\text{Cl}_{2(\text{g})}$  generado en el primer reservorio hasta el segundo, donde se han añadido previamente 1,3 g de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Este segundo reservorio se encuentra sumergido en un baño de acetona y  $\text{N}_{2(\text{liq})}$  a aproximadamente  $-70^\circ\text{C}$  para minimizar las pérdidas del  $\text{Cl}_{2(\text{g})}$  generado.

Transcurrido el tiempo necesario para la completa oxidación del  $^{37}\text{Cl}^-$  a  $^{37}\text{Cl}_{2(\text{g})}$ , todo el  $^{37}\text{Cl}_{2(\text{g})}$  generado se encuentra disuelto en el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  del segundo reservorio. Con ayuda de una jeringa se extrae el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y se trasvasa a un vial donde tendrá lugar la segunda reacción.



*Figura 3.1* Reacción de formación de  $^{37}\text{Cl}_2(\text{g})$  y fotografía del sistema de vidrio diseñado específicamente para esta reacción.

### 3.2.1.2 Cloración del bifenilo

Esta reacción consiste en la adición electrófila del  $^{37}\text{Cl}_2(\text{g})$  sobre el bifenilo. Para ello se mezclan en un vial el bifenilo disuelto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 12 mg de tricloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) que actúa como catalizador, y el  $^{37}\text{Cl}_2(\text{g})$  disuelto en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  generado en la anterior reacción. Todo ello se deja reaccionar aplicando agitación magnética a  $40^\circ\text{C}$  durante 6h. Una vez transcurrido el tiempo, la reacción se detiene añadiendo agua ultra-pura, formándose dos fases. La fase acuosa, a la que han pasado sales y otras impurezas iónicas del catalizador se retira y se limpia la fase orgánica tres veces mediante la adición de agua. A continuación se hace pasar la fase orgánica donde se encuentran disueltos los PCBs enriquecidos isotópicamente, a través de una columna de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . La finalidad de esta columna de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  es la de eliminar las trazas de agua que hayan podido quedar en la fase orgánica. El siguiente paso es evaporar el disolvente orgánico ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) mediante una corriente de  $\text{N}_2(\text{g})$  hasta sequedad. Finalmente, se redissuelve el residuo en aproximadamente 1 mL de isooctano. Se utiliza isooctano como disolvente final debido, no solo a su elevado punto de ebullición ( $99^\circ\text{C}$ ) sino también a la buena estabilidad de los PCBs en este disolvente.

Para obtener disoluciones individuales de los 12 congéneres en estudio se realizaron dos síntesis independientes en las que se añadieron distintas cantidades de bifenilo. Por una parte se añadieron 12,5 mg de bifenilo para obtener un crudo de síntesis que presentase congéneres con un bajo grado de cloración (desde los triclorados hasta los pentaclorados), y por otro lado se añadieron 5,5 mg de bifenilo para obtener un crudo de síntesis con congéneres con un grado mayor de cloración (desde hexaclorados hasta octaclorados). La optimización de las cantidades de bifenilo se discute en la sección de la discusión integradora.

#### **3.2.1.3 Purificación de los congéneres de PCBs enriquecidos isotópicamente**

Utilizando los parámetros instrumentales descritos en la Tabla 3.1 se llevó a cabo la purificación de los congéneres de PCBs enriquecidos isotópicamente. Para los congéneres menos clorados la fase móvil empleada estuvo compuesta de 80% acetonitrilo y 20% H<sub>2</sub>O, mientras que en la purificación del crudo de reacción donde se formaron los PCBs más clorados la fase móvil fue 100% acetonitrilo. En estas condiciones se recogieron distintas fracciones coincidiendo con el tiempo de retención de los 12 congéneres prioritarios y se evaporaron hasta sequedad. Finalmente se redisolvieron cada una de estas fracciones en isooctano obteniendo para cada uno de los 12 PCBs enriquecidos en <sup>37</sup>Cl una disolución individual. A partir de estas disoluciones individuales se preparó una mezcla de los doce congéneres para utilizarla como trazador isotópico en el análisis de muestras reales.

#### **3.2.2 Procedimiento de extracción de PCBs en muestras sólidas mediante microondas focalizadas**

En un tubo de ensayo de vidrio de 10 mL se añade entre 0,1 y 0,2 gramos de la muestra sólida, 0,3 g de acetona y una cantidad apropiada de la disolución de PCBs enriquecidos en <sup>37</sup>Cl. La cantidad de disolución de trazador se selecciona en cada experimento con el objetivo de añadir un número de moles de PCBs similar al del número de moles de PCBs naturales presentes en la alícuota de la muestra. En todos los casos, las cantidades de muestra y trazador isotópico se pesaron utilizando una balanza analítica. Posteriormente se añadieron 4 mL del disolvente extractante y un imán magnético para la agitación de la muestra durante la extracción por microondas focalizadas. El disolvente utilizado para la extracción de PCBs en sedimentos fue 4 mL de una mezcla hexano:acetona (1:1) mientras que para la extracción en materiales biológicos se utilizó

4 mL de isooctano. Para las matrices de sedimento las condiciones de la extracción por microondas focalizadas fueron 4 min a 70°C, y para las matrices biológicas se aumentó el tiempo de extracción hasta los 8 min a 70°C. El límite de potencia máxima empleado en el equipo de microondas fue en todos los casos de 250 W. Tras la extracción, los extractos se centrifugaron durante 5 min a 3000 rpm. Posteriormente, se realizó una limpieza de los extractos utilizando una columna de Florisil® hecha en el laboratorio con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio y lana de vidrio utilizando una cantidad aproximada de 0,5 g Florisil®. En primer lugar, la columna se acondicionó añadiendo aproximadamente 1 mL del disolvente de extracción, a continuación se añadió el extracto, y por último, 1 mL de disolvente de extracción. Finalmente, el extracto y el disolvente de extracción añadido posteriormente a la muestra se recoge en un vial y se evapora mediante una corriente de N<sub>2(g)</sub>, hasta un volumen aproximado de 50 µL almacenándose en un vial con inserto hasta su inyección en el cromatógrafo de gases.

#### **3.2.3 Procedimiento de preparación de muestra para la determinación de los diastereoisómeros $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ del Hexabromociclododecano (HBCD) en aguas mediante LC-ESI-MS/MS**

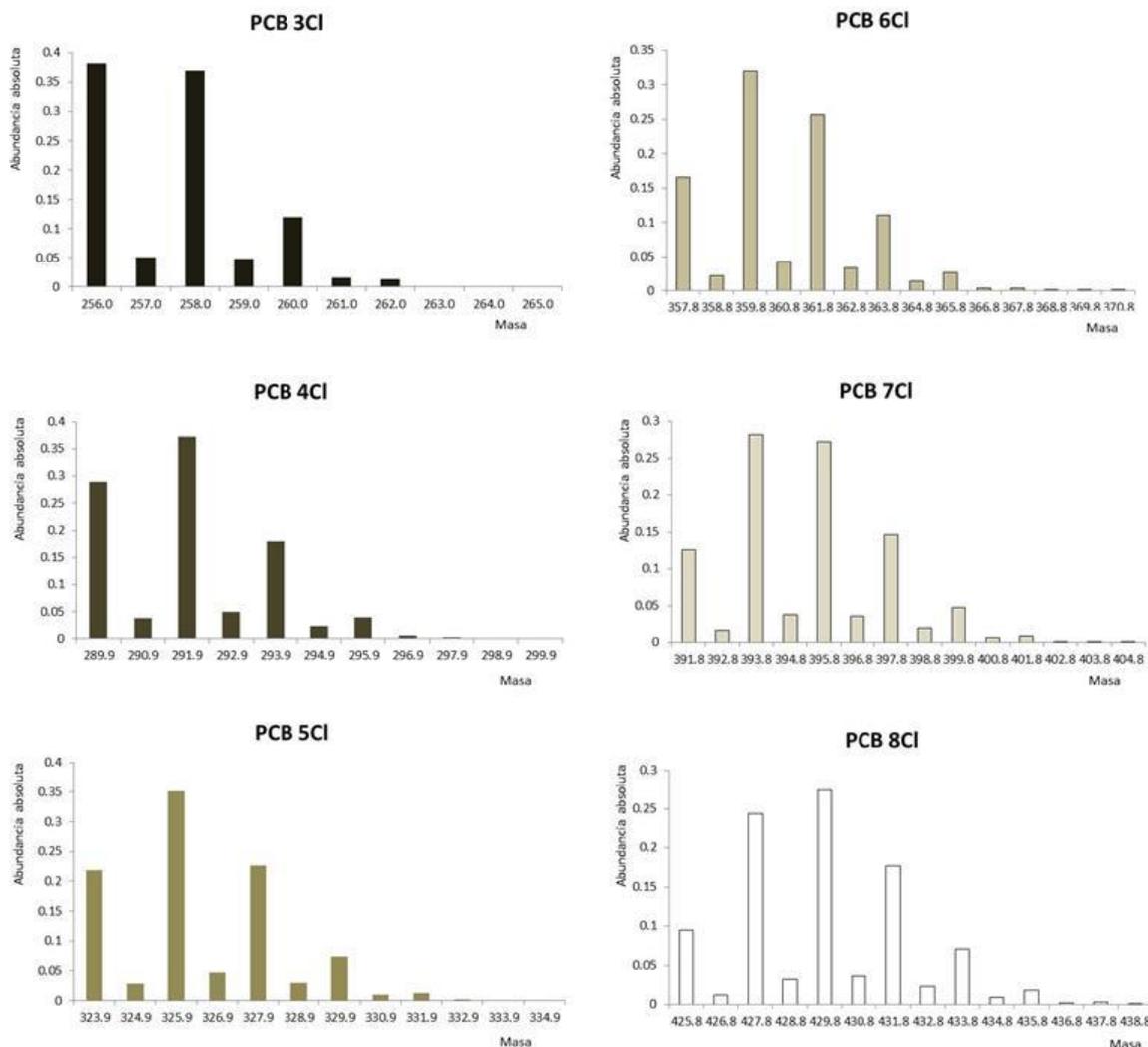
En un matraz aforado de vidrio de 500 mL se añade en primer lugar un volumen aproximado de 100 mL de muestra y se coloca el matraz en una balanza analítica. Tras tarar la balanza, se añaden 0,2 g de las disoluciones individuales de 1 ng g<sup>-1</sup> de cada uno de los tres diastereoisómeros del HBCD enriquecidos en <sup>81</sup>Br. Posteriormente el matraz aforado se retira de la balanza y se enrasa a 500 mL con más volumen de muestra. Se tapa el matraz con un tapón de vidrio y se agita durante aproximadamente un minuto para conseguir una mezcla homogénea entre los analitos presentes en la propia muestra y los análogos enriquecidos añadidos. A continuación, se añaden 2 mL de hexano y se agita manualmente el matraz durante 10 minutos. Tras la agitación, se extrae la fase orgánica la cual se evapora bajo una corriente de N<sub>2(g)</sub> hasta sequedad. Finalmente, se redisuelve la muestra en 25 µL de la fase móvil (25% agua y acetato de amonio 10 mM y 75% MeOH:ACN 80:20) y se inyectan 20 µL en el sistema HPLC-MS/MS.

### **3.3 Procedimientos matemáticos**

#### **3.3.1 Estudio del patrón de fragmentación de los PCBs en la fuente de ionización electrónica (EI)**

La distribución isotópica de los compuestos en estudio se calcula de forma teórica basándose en la función distribución binomial, mediante un programa de Visual Basic escrito como macro para Excel basado en el algoritmo descrito por *Kubinyi*<sup>1</sup>. Con este programa se puede calcular la distribución isotópica del clúster molecular en estudio, tanto de las especies con abundancia isotópica natural como de las especies con abundancia isotópica alterada (compuestos marcados). El programa de cálculo utilizado a lo largo de la presente Tesis Doctoral permite obtener los espectros de masas teóricos de cada uno de los compuestos en estudio. En la Figura 3.2 se observan los espectros teóricos para los PCBs de abundancia isotópica natural con distintos grados de cloración que van desde 3 a 8 átomos de Cl en la molécula.

Según estudios preliminares existentes en la bibliografía<sup>2</sup>, en la fuente de ionización electrónica se puede producir la pérdida o ganancia de átomos de hidrógeno en el ion molecular (M) generando especies ( $M \pm nH^+$ , donde n puede variar de 1 a 4). Como también se ha explicado en la introducción, con el uso de la deconvolución de perfiles isotópicos (IPD), se puede obtener la contribución al clúster del ion molecular de todas estas posibles especies formadas en la fuente. Por todo ello es necesario el estudio de la pureza espectral o patrón de fragmentación que siguen los compuestos de interés para una medida correcta de la distribución isotópica de los analitos.



**Figura 3.2** Espectros de masas teóricos de los PCBs de abundancia isotópica natural para distintos grados de cloración obtenidos mediante un programa de cálculo desarrollado previamente<sup>3</sup>.

Para realizar el estudio de la fragmentación de los PCBs en la fuente EI se utilizó una disolución estándar comercial que contiene los doce congéneres en estudio a una concentración aproximada de  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ . Para obtener la distribución isotópica experimental, se midieron para cada uno de los PCBs las masas que se indican en la Tabla 3.7 utilizando el modo de medida SIM (Selected Ion Monitoring). Mediante el uso de la función “Estimación lineal” de Excel, se calcularon las contribuciones de cada una de las especies moleculares al clúster del ion molecular según la ecuación 3.1.

$$\begin{bmatrix} A_{exp}^1 \\ A_{exp}^2 \\ A_{exp}^3 \\ \dots \\ A_{exp}^{n-1} \\ A_{exp}^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{M^+}^1 & A_{M-1^+}^1 \\ A_{M^+}^2 & A_{M-1^+}^2 \\ A_{M^+}^3 & A_{M-1^+}^3 \\ \dots & \dots \\ A_{M^+}^{n-1} & A_{M-1^+}^{n-1} \\ A_{M^+}^n & A_{M-1^+}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{M^+} \\ X_{M-1^+} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (3.1)$$

En esta ecuación los términos  $A_{exp}^1$ ,  $A_{exp}^2$ , ...  $A_{exp}^n$  se corresponden con las abundancias isotópicas experimentales, medidas para cada uno de los clúster moleculares de los distintos congéneres de PCBs, medidos en modo SIM con los m/z de la Tabla 3.7. Por otra parte, los términos  $A_{M^+}^1$ ,  $A_{M^+}^2$ ... $A_{M^+}^n$  hacen referencia a las abundancias isotópicas calculadas para el ion molecular ( $M^+$ ) generado en la fuente EI; y los términos  $A_{M-1^+}^1$ ,  $A_{M-1^+}^2$ ... $A_{M-1^+}^n$  corresponden a las abundancias isotópicas teóricas para el ion  $(M-1)^+$ .

$X_{M^+}$ ,  $X_{M-1^+}$  se corresponden con las fracciones molares de las especies ( $M^+$ ) y  $(M-1)^+$  generadas en la fuente de ionización.

En este tipo de ecuaciones donde aparecen más parámetros (abundancias) que incógnitas (fracciones molares) es necesario añadir en la ecuación el vector error del ajuste ( $e^1$ ,  $e^2$ ... $e^n$ ).

**Tabla 3.7** Rango de masas medidas en modo SIM para cada grado de cloración durante el estudio de la pureza espectral de los PCBs.

Nº de átomos de Cl	Masas por clúster
3	254,0 – 262,0
4	287,9 – 296,9
5	321,9 – 331,9
6	355,8 – 366,8
7	389,8 – 401,8

8	423,8 – 435,8
---	---------------

### 3.3.2 Medida de la composición isotópica de Cl para la determinación de PCBs mediante IDMS utilizando equipos GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS y GC-NCI-MS

#### 3.3.2.1 Corrección del efecto de la discriminación de masas

Usando las fuentes de ionización ICP y NCI, se midió la relación isotópica  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  específica de cada congénere de PCB para realizar la cuantificación por IDMS. Cabe resaltar que utilizando equipos ICP-MS se produce una transmisión más eficiente de los iones más pesados frente a los más ligeros que se conoce como “discriminación de masas”. Este efecto no se ha descrito en equipos con fuente NCI. A lo largo de la presente Tesis Doctoral se realizó una corrección de discriminación de masas mediante la comparación de las medidas experimentales de patrones naturales con la relación isotópica teórica (obtenida por la composición isotópica de los elementos de la IUPAC<sup>4</sup>).

La corrección del efecto de discriminación de masas se realizó aplicando un modelo lineal, tal y como se muestra en la ecuación 3.2 donde se asume que el error cometido entre la medida experimental y teórica de una relación isotópica depende linealmente de la diferencia de masa entre los isótopos involucrados.

$$K = \frac{R_{exp} - R_{cor}}{R_{cor} \cdot \Delta M} \quad (3.2)$$

Donde:

$R_{cor}$  y  $R_{exp}$  son las relaciones isotópicas corregida y experimental respectivamente.

$K$  es el factor de discriminación de masa.

$\Delta M$  es la diferencia de masa entre los isótopos.

Desde un punto de vista experimental la corrección se realiza midiendo un patrón de abundancia isotópica natural entre cada tres muestras (“bracketing”). De este modo, aplicando la ecuación 3.2 se calcula el factor  $K$  antes y después del triplicado de la

muestra y se utiliza el promedio de ambos valores para corregir la medida de la relación isotópica de la mezcla utilizando la ecuación 3.3.

$$R_{cor} = \frac{R_{exp}}{1 + k \cdot \Delta M} \quad (3.3)$$

Con la relación  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  corregida específica de cada congénere de PCB, se calculan las abundancias isotópicas del Cloro para aplicar IDMS en la cuantificación de patrones o muestras reales.

#### 3.3.2.2 Corrección del tiempo muerto del detector

Cuando se utilizó el sistema GC-NCI-MS se evaluó la necesidad de corregir el tiempo muerto del detector. Este estudio no se realizó cuando se emplearon los equipos GC-ICP-MS y GC-ICP-MS/MS ya que el tiempo muerto de los detectores ya se había optimizado previamente. Para las medidas con el equipo GC-NCI-MS se utilizaron mezclas de distinta concentración (100, 500 y 1000 ng g<sup>-1</sup>) de una mezcla de los 12 PCBs con la finalidad de estudiar si la concentración afectaba a la medida de la relación  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ . Esta corrección se lleva a cabo utilizando la ecuación (3.4):

$$I_{corregida} = \frac{I_{exp}}{1 - I_{exp} \cdot \tau} \quad (3.4)$$

Donde:

$I_{exp}$  es la relación de las intensidades medidas de cada los isótopos  $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$ .

$I_{corregida}$  es relación de las intensidades corregida teniendo en cuenta el tiempo muerto del detector.

$\tau$  es el tiempo muerto del detector.

Aplicando la ecuación anterior se calcula  $I_{corregida}$  dando distintos valores de  $\tau$ , tanto para las intensidades obtenidas para  $^{35}\text{Cl}$ , como las obtenidas para  $^{37}\text{Cl}$ . Se calcula la relación  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  y a las distintas concentraciones de trabajo, se haya el promedio y la desviación estándar. El valor de  $\tau$  optimizado será aquel para el que la desviación estándar se hace mínima.

### 3.3.3 Determinación del enriquecimiento isotópico de los compuestos marcados utilizados

La determinación del enriquecimiento isotópico de los compuestos enriquecidos isotópicamente utilizados a lo largo de la presente Tesis Doctoral es necesaria para desarrollar las metodologías IDMS empleadas. A lo largo de esta Tesis se ha utilizado el método desarrollado anteriormente en nuestro laboratorio<sup>5</sup> en el que se realizan al menos cinco inyecciones consecutivas de los compuestos enriquecidos isotópicamente: congéneres de PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  y diastereoisómeros del HBCD enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$ . Para ello, se monitorizan las masas de todos los isotopólogos que componen el clúster en estudio para medir su distribución isotópica en modo SIM. En el caso de los PCBs en la fuente EI se inyectaron disoluciones de los 12 congéneres a un nivel de  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  mientras que en el caso de los diastereoisómeros del HBCD se inyectó una disolución de los tres diastereoisómeros a un nivel de  $1 \mu\text{g g}^{-1}$ . El rango de valores  $m/z$  medidos para cada uno de los compuestos se muestran en la Tabla 3.8.

**Tabla 3.8** Rango de valores  $m/z$  medidos en modo SIM para la determinación del enriquecimiento isotópico de los congéneres de PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  y los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$ .

Compuesto	Masas (m/z)
PCBs Triclorados	257,0-265,0
PCBs Tetraclorados	292,9-300,9
PCBs Pentaclorados	328,9-336,9
PCBs Hexaclorados	363,8-371,8
PCBs Heptaclorados	399,8-407,8
PCBs Octaclorados	435,8-443,8
$\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ - HBCD	638,6-649,6

Una vez calculada la distribución isotópica en cada una de las inyecciones de los compuestos enriquecidos se utiliza un programa de Visual Basic para Excel en el que se pueden calcular hasta 100 distribuciones isotópicas para una molécula marcada en un intervalo de enriquecimientos isotópicos seleccionado por el usuario. La pureza espectral calculada como se explica en la sección 3.3.1 se tiene en cuenta para corregir las distribuciones isotópicas. Finalmente, las distribuciones isotópicas medidas en cada una de las inyecciones de los patrones del compuesto enriquecido se comparan mediante regresión lineal con las 100 distribuciones isotópicas previamente calculadas. De este modo, el enriquecimiento isotópico óptimo se selecciona como aquel que proporciona un mínimo en la suma cuadrática de los residuales obtenidos entre las distribuciones isotópicas calculadas y las experimentales. Todos estos cálculos pueden realizarse según una hoja de Excel creada para tal finalidad, descrita en una publicación anterior<sup>5</sup>. Cuando se utilizaron espectrómetros de masa equipados con fuentes de ionización ICP o NCI no se utilizó esta metodología ya que estas fuentes de ionización permiten medir directamente el enriquecimiento isotópico del Cl mediante la medida de la relación isotópica  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ .

#### 3.3.4 Determinación de compuestos orgánicos mediante IDMS utilizando regresión lineal múltiple

A lo largo de la presente Tesis Doctoral, la regresión lineal múltiple ha sido la herramienta matemática utilizada para la determinación de la concentración de un compuesto mediante IDMS. Esta herramienta se ha utilizado, tanto para determinar la concentración de un trazador isotópico (mediante dilución isotópica inversa), como para llevar a cabo la cuantificación de un compuesto natural en muestras reales o en materiales de referencia certificados.

##### 3.3.4.1 Cuantificación de PCBs mediante el uso de análogos enriquecidos en $^{37}\text{Cl}$

La determinación de PCBs mediante IDMS se llevó a cabo a lo largo de la presente Tesis Doctoral mediante una regresión lineal múltiple, aplicando la ecuación 3.5:

$$\begin{bmatrix} I_{exp}^a \\ I_{exp}^b \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^a & A_{lab}^a \\ A_{nat}^b & A_{lab}^b \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} \quad (3.5)$$

Cuando se utilizan los sistemas GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS y GC-NCI-MS los términos  $I_{\text{exp}}^{\text{a}}$ ,  $I_{\text{exp}}^{\text{b}}$  corresponden a las intensidades medidas experimentalmente a  $m/z$  35 y  $m/z$  37. Sin embargo, cuando se utiliza un sistema GC-MS en modo SIM, estos términos  $I_{\text{exp}}^{\text{a}}$ ,  $I_{\text{exp}}^{\text{b}}$  corresponden a las intensidades de los isotopólogos del clúster del ion molecular, que contienen solamente  $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$ , respectivamente. Finalmente, cuando se utiliza un equipo GC-EI-MS/MS en modo SRM los términos  $I_{\text{exp}}^{\text{a}}$ ,  $I_{\text{exp}}^{\text{b}}$  corresponden a las intensidades de los iones producto obtenidas tras la fragmentación de los isotopólogos del clúster del ion molecular, que contienen solamente  $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$ , respectivamente.

Por otra parte,  $A_{\text{nat}}^{\text{a}}$ ,  $A_{\text{lab}}^{\text{a}}$ ,  $A_{\text{nat}}^{\text{b}}$ ,  $A_{\text{lab}}^{\text{b}}$  corresponden con las abundancias de los isótopos  $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$  específicas del compuesto natural y del análogo enriquecido isotópicamente para cada PCB cuando se utilizan los sistemas GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS y GC-NCI-MS. Sin embargo, cuando se utiliza un sistema GC-EI-MS y GC-EI-MS/MS dichas abundancias se corresponden con las abundancias de los iones precursores  $^{12}\text{C}_{12} \text{H}_x \text{Cl}_y$  y  $^{12}\text{C}_{12} \text{H}_x \text{Cl}_y$  específicas del compuesto natural y del análogo enriquecido isotópicamente para cada congénere de PCB. Finalmente,  $X_{\text{nat}}$  es la fracción molar del compuesto de abundancia isotópica natural y  $X_{\text{lab}}$  es la fracción molar del compuesto enriquecido isotópicamente.

El sistema matricial de la ecuación (3.5) se puede resolver mediante regresión lineal múltiple aplicando la función de Excel “Estimación lineal” que permite obtener directamente las fracciones molares  $X_{\text{nat}}$  y  $X_{\text{lab}}$ . Teniendo en cuenta que la relación de fracciones molares es igual a la relación de moles de compuesto natural y análogo enriquecido (ecuación 3.6), el número de moles del compuesto con abundancia isotópica natural en la muestra se puede determinar fácilmente si se conoce el número de moles de compuesto enriquecido isotópicamente que se añadieron a la muestra.

$$\frac{X_{\text{nat}}}{X_{\text{lab}}} = \frac{n_{\text{nat}}}{n_{\text{lab}}} \quad (3.6)$$

Para conocer el número de moles añadidos de compuesto enriquecido es necesario realizar una determinación previa de la concentración de la disolución de trazador isotópico. Este procedimiento denominado dilución isotópica inversa consiste en

mezclar una cantidad conocida de patrón natural con una alícuota del patrón enriquecido. A lo largo de la presente Tesis Doctoral, se realizaron en cada experimento de dilución isotópica inversa al menos tres mezclas independientes, inyectadas cada una de ellas por triplicado en distintos días de medida. De este modo, no solo se pudo estudiar la repetitividad sino también la reproducibilidad de los resultados.

En la Tabla 3.9 se pueden observar las condiciones experimentales utilizadas en el sistema GC-EI-MS/MS empleando el modo de adquisición SRM para la determinación de PCBs mediante IDMS en muestras y trazadores isotópicos. La Tabla 3.9 también muestra las fórmulas moleculares de los iones precursores e iones producto y las relaciones m/z de cada una de las transiciones SRM medidas.

**Tabla 3.9** Energía de colisión, fórmulas de los iones precursores e iones producto, y relaciones m/z de las transiciones SRM utilizadas para la determinación de PCBs mediante IDMS y GC-EI-MS/MS.

PCBs	Energía de colisión (V)	Análogos	Fórmula Ion Precursor	Ion Precursor m/z	Fórmula Ion Producto	Ion Producto m/z
Triclorados	28 (PCB-18)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_7^{35}\text{Cl}_3$	256	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_7^{35}\text{Cl}$	186
	26 (PCB-28+31)	Enriquecido	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_7^{37}\text{Cl}_3$	262	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_7^{37}\text{Cl}$	188
Tetraclorados	24 (PCB-52)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_6^{35}\text{Cl}_4$	289.9	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_6^{35}\text{Cl}_2$	220
	26 (PCB-44)	Enriquecido	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_6^{37}\text{Cl}_4$	297.9	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_6^{37}\text{Cl}_2$	224
Pentaclorados	28 (PCB-101)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_5^{35}\text{Cl}_5$	323.9	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_5^{35}\text{Cl}_3$	253.9
	32 (PCB-118)	Enriquecido	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_5^{37}\text{Cl}_5$	333.9	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_5^{37}\text{Cl}_3$	260
Hexaclorados	32 (PCB-149, PCB-153)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_4^{35}\text{Cl}_6$	357.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_4^{35}\text{Cl}_4$	287.9
	36 (PCB-138)	Enriquecido	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_4^{37}\text{Cl}_6$	369.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_4^{37}\text{Cl}_4$	296
Heptaclorados	30 (PCB-180)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_3^{35}\text{Cl}_7$	391.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_3^{35}\text{Cl}_5$	321.9
		Enriquecido	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_3^{37}\text{Cl}_7$	405.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_3^{37}\text{Cl}_5$	331.9

Octaclorados	28 (PCB-194)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}_8$	425.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}_6$	355.8
		Enriquecido	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_2^{37}\text{Cl}_8$	441.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_2^{37}\text{Cl}_6$	367.9

Como se puede observar en la Tabla 3.9, en el equipo GC-EI-MS/MS se han medido para cada uno de los 12 congéneres de PCBs en estudio dos transiciones, una correspondiente a la masa del isotópologo con abundancia isotópica natural y otra transición correspondiente al isotópologo con abundancia isotópica enriquecida. Ambos iones precursores tienen como mecanismo de fragmentación más probable en la celda de colisión la pérdida de dos átomos de Cl. De este modo, los iones producto tienen la propiedad de conservar las abundancias isotópicas de los iones precursores.

Cuando se determinaron PCBs mediante el uso de equipos con fuentes elementales como GC-ICP-MS y GC-NCI-MS, se midieron los isótopos  $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$ , o en el caso del equipo GC-ICP-MS/MS triple cuadrupolo se midió la transición, por la reacción del Cl con un gas de reacción ( $\text{H}_2$  en nuestro caso). En estos casos se utilizaron las abundancias isotópicas del Cloro en la ecuación 3.5. Además, se corrigió el efecto de discriminación de masas y el tiempo muerto del detector como se ha explicado en la sección 3.3.2.

#### 3.3.4.2 Cuantificación de los diastereoisómeros del HBCD mediante el uso de análogos enriquecidos en $^{81}\text{Br}$ mediante LC-ESI-MS/MS

En el caso de la determinación de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  del HBCD mediante LC-ESI-MS/MS se empleó una estrategia similar a la utilizada con los PCBs, basada en la aplicación de la regresión lineal múltiple como se describe en la ecuación (3.7):

$$\begin{bmatrix} I_{exp}^a \\ I_{exp}^b \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat,corr}^a & A_{lab}^a \\ A_{nat}^b & A_{lab}^b \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} \quad (3.7)$$

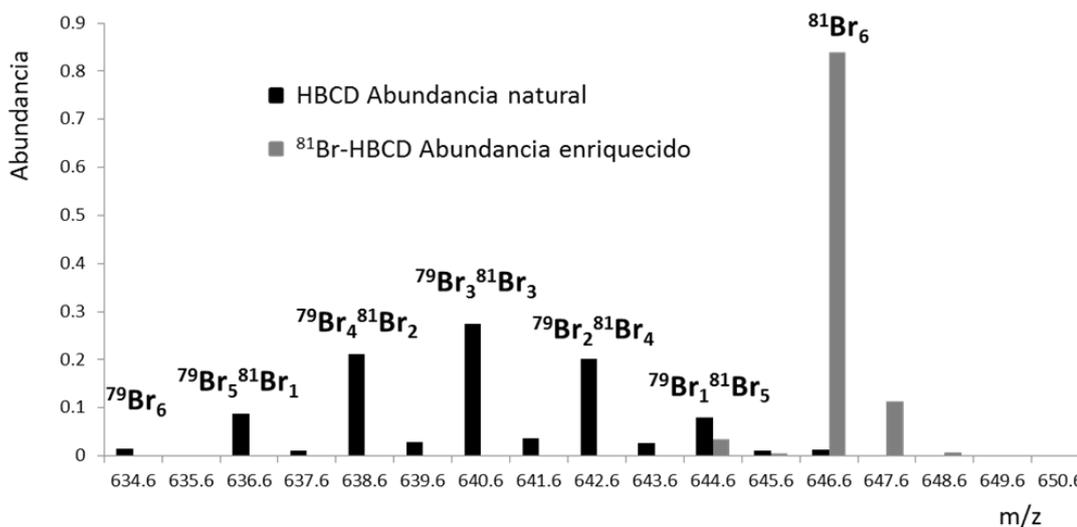
En esta ecuación los términos  $I_{exp}^a$ ,  $I_{exp}^b$  corresponden a las intensidades de los iones producto 78,9 y 80,9 respectivamente, obtenidas tras la fragmentación de los isotópolos del clúster del ion molecular  $[\text{HBCD-H}]^-$ . Concretamente el ion precursor para  $I_{exp}^a$  corresponde al isotópologo  $^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_{17}^{79}\text{Br}_4^{81}\text{Br}_2$  (m/z 638,6) y se toma como isotópologo de referencia para el compuesto de abundancia isotópica natural. Por otra

parte el ion precursor para  $I_{exp}^b$  corresponde al isotopólogo  $^{12}C_{12}^{1}H_{17}^{81}Br_6$  (m/z 646,6) y se toma como isotopólogo de referencia para el compuesto de enriquecido en  $^{81}Br$ . En la Figura 3.3 se muestra la distribución isotópica del clúster de medida  $[HBCD-H]^-$  tanto para los compuestos de abundancia isotópica natural, como para los compuestos de abundancia isotópica enriquecida. En ella se puede apreciar que existe una contribución distinta de los isótopos  $^{79}Br$  y  $^{81}Br$  en cada uno de los isotopólogos.

El mecanismo de fragmentación más probable que sufren los diastereoisómeros del HBCD en la celda de colisión es la pérdida de átomos de Br de modo que los iones producto más intensos corresponden a los iones del Bromo a m/z 78,9 y 80,9.

Los términos  $A_{nat,corr}^a$ ,  $A_{lab}^a$ ,  $A_{nat}^b$ ,  $A_{lab}^b$ , al igual que sucedía en el caso de los PCBs para la fuente EI, deben corresponder a las abundancias isotópicas de los iones precursores  $^{12}C_{12}^{1}H_{17}^{79}Br_4^{81}Br_2$  y  $^{12}C_{12}^{1}H_{17}^{81}Br_6$ . Sin embargo, debido a que los iones producto son los iones del Br es necesario corregir (multiplicando por 4/6) la abundancia del isotopólogo de referencia para el compuesto natural  $A_{nat,corr}^a$  de modo que se tenga en cuenta la contribución de los isótopos  $^{79}Br$  y  $^{81}Br$  en el isotopólogo empleado como ion precursor.

Los términos  $X_{nat}$  y  $X_{lab}$  se corresponden con las fracciones molares del compuesto natural y enriquecido. Estas fracciones se obtienen resolviendo el sistema matricial de la ecuación (3.7) con ayuda de la función Excel “Estimación lineal”. Al igual que sucedía en el caso de los PCBs, utilizando la ecuación (3.6), una vez calculadas las fracciones molares y conocidos el número de moles de compuesto enriquecido añadidos inicialmente, se obtiene el número de moles de abundancia isotópica natural presente en la muestra a determinar.



**Figura 3.3** Distribución isotópica para los clúster de medida [HBCD-H]<sup>-</sup>, tanto para los compuestos con abundancia isotópica natural (color negro), como para los compuestos con abundancia isotópica enriquecida (color gris) indicando la contribución de los isótopos <sup>79</sup>Br y <sup>81</sup>Br en los distintos isotopólogos.

### 3.3.5 Determinación de PCBs mediante IDMS utilizando un calibrado metodológico

El calibrado metodológico es la forma clásica de llevar a cabo la cuantificación de compuestos orgánicos mediante IDMS. Este método está basado en establecer empíricamente la dependencia entre la relación de intensidades experimentales (áreas de pico) de analito y análogo enriquecido con su relación de moles. Para ello, es necesario construir una curva de calibrado preparando disoluciones con cantidades crecientes de los analitos a las que se les añade una cantidad constante de análogo enriquecido (patrón interno).

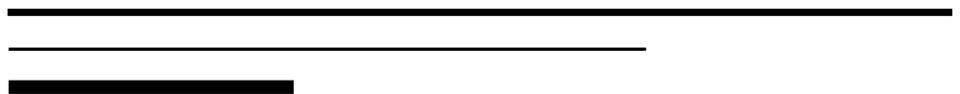
En la presente Tesis Doctoral, se prepararon disoluciones mezcla de los 12 congéneres de PCBs, en un rango de concentración desde 20 ng g<sup>-1</sup> a 250 ng g<sup>-1</sup>. A todas las disoluciones del calibrado se les añadió la misma cantidad de la mezcla de compuestos marcados en 12 átomos de <sup>13</sup>C (<sup>13</sup>C<sub>12</sub>-PCBs) en una concentración constante de 50 ng g<sup>-1</sup>. Estas disoluciones se midieron en el modo de adquisición SRM; las transiciones correspondientes a los PCBs de abundancia isotópica natural son las mismas que se pueden observar en la Tabla 3.9. Para los compuestos enriquecidos en <sup>13</sup>C las transiciones medidas fueron las siguientes: 302,0 → 232,0; 335,9 → 266,0; 371,8 → 301,9; 405,8 → 335,9 para las especies tetra-, penta-, hexa- y heptacloradas,

respectivamente. Cabe destacar, que utilizando esta metodología no se pudieron cuantificar los 12 congéneres en estudio ya que únicamente 5 de ellos (PCB-52, PCB-101, PCB-153, PCB-138 y PCB-180) se pudieron adquirir marcados en  $^{13}\text{C}$ .

Mediante el uso de esta aproximación empírica no es necesario determinar previamente ni la concentración ni el enriquecimiento isotópico de los análogos enriquecidos siempre y cuando, se controle con exactitud la cantidad añadida a los patrones del calibrado y a las muestras. Con la medida instrumental de las citadas transiciones se representa la relación de áreas frente a la relación de moles, y al no existir solapamiento espectral entre el compuesto natural y enriquecido se obtiene una recta de calibrado cuya ecuación se utiliza para realizar la interpolación de la relación de señales obtenidas en las muestras, y obtener la concentración del compuesto de abundancia isotópica natural.

- <sup>1</sup> H. Kubinyi. **Calculation of isotope distributions in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problem.** *Analytica Chimica Acta.* (1991), 247, 107-119.
- <sup>2</sup> A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J. I. García Alonso. **Evaluation of minimal <sup>13</sup>C-labelling for stable isotope dilution in organic analysis.** *Analyst.* (2010), 135, 953-964.
- <sup>3</sup> J. Ignacio García Alonso, P. Rodríguez-González, A. González-Gago, A. González-Antuña. **Determination of the uncertainties in the theoretical mass isotopomer distribution of molecules.** *Analytica Chimica Acta.* (2010), 664, 68-76.
- <sup>4</sup> J. Meija, T. B. Coplen, M. Berglund, W. A. Brand, P. De Bièvre, M. Gröning, N. E. Holden, J. Irrgeher, R. D. Loss, T. Walczyk and T. Prohaska. **Isotopic compositions of the elements 2013 (IUPAC Technical Report).** *Pure Applied Chemistry.* (2016), vol 88, num 3, 293-306.
- <sup>5</sup> A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, J. Ignacio García Alonso. **Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry.** *Journal of Mass Spectrometry.* (2014), 49, 681-691.

## **4. Resultados**





**4.1 Determinación de bifenilos policlorados en muestras sólidas mediante dilución isotópica y espectrometría de masas utilizando análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$**

**Artículo científico 1: Determination of polychlorinated biphenyls in solid samples by isotope dilution mass spectrometry using  $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues**

Lourdes Somoano-Blanco, Pablo Rodríguez-González, Sergio García Fonseca, and J. Ignacio García Alonso.

*Analytical Chemistry*, 2015, 87, 7840-7847.

### 4.1.1 Introducción

Los PCBs son compuestos orgánicos clorados, considerados contaminantes orgánicos persistentes según el Convenio de Estocolmo. Hoy en día se encuentran legislados e incluso su fabricación está prohibida, existiendo normativas y plazos a nivel internacional para la descontaminación de maquinaria u objetos que los contengan. Estos contaminantes han sido introducidos en la atmósfera y se encuentran ampliamente distribuidos por todo el planeta, incluyendo zonas alejadas de los focos de contaminación como el Ártico. Debido a sus efectos tóxicos sobre los seres vivos, se requiere el desarrollo de métodos analíticos fiables para su determinación y control en muestras medioambientales y biológicas.

Los métodos analíticos tradicionales que se emplean para la determinación de PCBs en muestras reales consisten en el acoplamiento de la cromatografía de gases, con detectores como el de captura electrónica (ECD), inmunoensayos, y más recientemente con la espectrometría de masas. Para calcular su concentración y llevar a cabo la cuantificación de PCBs se suele aplicar un calibrado metodológico utilizando patrones internos, como por ejemplo análogos de PCBs enriquecidos en  $^{13}\text{C}$ .

En el primer artículo de la presente Tesis Doctoral, se ha desarrollado una metodología analítica para la determinación de los PCBs mediante IDMS utilizando compuestos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ . Para ello, se ha llevado a cabo la síntesis de los análogos enriquecidos, así como su purificación, obteniendo una “mezcla de trabajo” formada por doce congéneres de interés enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ . Esta mezcla incluye seis PCBs denominados “non-dioxin-like” (28, 52, 101, 138, 153 y 180) considerados como indicadores por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA (*European Food Safety Authority*). El PCB-118, considerado “dioxin-like” con un factor de equivalencia asignado por WHO (World Health Organization), y los congéneres 18, 31, 44, 149 y 194 con relevancia medioambiental, presentes como congéneres mayoritarios en las mezclas comerciales. La metodología desarrollada en este trabajo aporta una serie de ventajas sobre otros métodos de cuantificación más clásicos como, la reducción del tiempo de análisis total ya que no es necesario la realización de un calibrado metodológico. Además, la utilización de compuestos enriquecidos en el heteroátomo disminuye posibles efectos isotópicos entre los análogos y sus análogos enriquecidos a lo largo de la

preparación de muestra y la separación cromatográfica, aumentando la exactitud y precisión de los resultados analíticos.

### 4.1.2 Objetivos

El objetivo principal de este capítulo fue el desarrollo de una metodología rápida y fiable basada en el análisis por dilución isotópica para la determinación de PCBs en muestras sólidas. Este objetivo principal se dividió en una serie de objetivos parciales:

- Síntesis y purificación de 12 congéneres de PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ .
- Preparación y caracterización (concentración y enriquecimiento isotópico) de una mezcla de 12 congéneres de PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ .
- Desarrollo de un procedimiento de extracción de PCBs en sedimentos, suelos y tejidos biológicos mediante microondas focalizadas.
- Determinación de PCBs mediante IDMS utilizando análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ -PCBs en varios materiales de referencia certificados.
- Comparación de la metodología de cuantificación desarrollada con la metodología clásica, basada en un calibrado metodológico y el uso de análogos enriquecidos en  $^{13}\text{C}$ .

## 4.1.3 Artículo científico 1

## Determination of polychlorinated biphenyls in solid samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry using $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues

Lourdes Somoano-Blanco, Pablo Rodríguez-González, Sergio García Fonseca, J. Ignacio García Alonso.

*Analytical Chemistry*, 2015, 87 (15), 7840-7847.

analytical  
chemistry

Article  
pubs.acs.org/chem

### Determination of Polychlorinated Biphenyls in Solid Samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry Using $^{37}\text{Cl}$ -Labeled Analogues

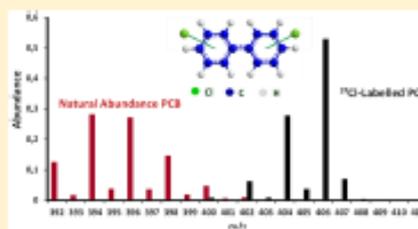
Lourdes Somoano-Blanco,<sup>†</sup> Pablo Rodríguez-González,<sup>\*,†</sup> Sergio García Fonseca,<sup>‡</sup> and J. Ignacio García Alonso<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

<sup>‡</sup>ISC-Science, Innovative Solutions in Chemistry, S.L. Edificio Científico-Tecnológico Campus de "El Cristo" 33006, Oviedo, Spain

Supporting Information

**ABSTRACT:** This work describes the first application of  $^{37}\text{Cl}$ -labeled compounds to isotope dilution mass spectrometry (IDMS). The synthesis of 12  $^{37}\text{Cl}$ -labeled polychlorinated biphenyls (PCBs) was carried out by the chlorination of biphenyl with isotopically enriched chlorine gas, generated by the direct oxidation of  $\text{Na}^{37}\text{Cl}$  with potassium peroxydisulfate. After an exhaustive purification due to the presence of other congeners, the concentration and the isotopic enrichment of all  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs in the mixture was determined. The proposed procedure allows the simultaneous quantification of every isotope diluted PCB congener in a single gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) injection without resorting to a methodological calibration graph. The results obtained here demonstrate that the use of  $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues provides results in agreement with the certified values of three different Certified Reference Materials (marine sediment SRM 1944, fish tissue 1947, and loamy soil CRM 962-50) and analytical figures of merit comparable to those obtained using regular IDMS procedures based on the use of commercially available  $^{12}\text{C}$ -labeled analogues.



Polychlorinated biphenyls (PCBs) are among the 12 persistent organic pollutants (POPs) included in the first list of the Stockholm Convention.<sup>1,2</sup> Since PCBs are fat-soluble and highly chemically stable compounds they persist for a long period of time in the environment and accumulate in biota.<sup>3</sup> A broad spectrum of toxicological properties is documented for PCBs including dermatological, carcinogenic, immunological, reproductive, and neurodevelopmental adversities.<sup>4,5</sup> PCBs were synthesized in large quantities during the last century for many industrial and commercial applications until their manufacture was banned in 1977.<sup>6</sup> However, despite the prohibition of their industrial production and use, they can still be found in the environment. Today it is known that PCBs are distributed at a global scale through atmospheric transport even in remote areas such as the Arctic and the Antarctic<sup>7</sup> and can be found in almost every environmental compartment including air, water, sediments, fish, and mammals.<sup>8,9</sup>

For these reasons, the development of reliable methods for PCBs determination in environmental samples is still highly important.<sup>10</sup> The analysis of a solid sample requires the quantitative extraction of all target PCBs from the matrix. This has been carried out during the past years applying different extraction techniques such as Soxhlet, microwave, sonication, supercritical fluid extraction (SFE), or pressurized liquid extraction (PLE).<sup>11–13</sup> Many of these techniques require long

extraction times and/or high amounts of organic solvents and expensive laboratory glassware. Recently, focused microwave technology has been proposed as a rapid and efficient technique capable of providing quantitative extraction of organometallic compounds<sup>14</sup> and Cr(VI)<sup>15</sup> in a few minutes using minimal amounts of sample and solvent.

Because of their relatively high volatility, PCBs are mainly determined in real samples using gas chromatography (GC) mainly coupled to mass spectrometry (MS).<sup>16</sup> Electron capture detection (ECD) is employed to a lesser extent as it provides a high sensitivity but suffers from a lack of selectivity due to electronegative interferences or the presence of other matrix halogenated compounds.<sup>19</sup> MS can be employed in combination with electron ionization (EI) or negative chemical ionization (NCI).<sup>20</sup> The use of NCI provides a higher sensitivity but a more limited selectivity as, similar to ECD, every chlorine-containing compound is detected. The use of EI increases selectivity as analyte-specific molecular fragments are detected. GC coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) with EI using selected reaction monitoring (SRM) mode

Received: April 23, 2015

Accepted: July 11, 2015

Published: July 11, 2015

**DETERMINATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN SOLID SAMPLES BY ISOTOPE DILUTION MASS SPECTROMETRY USING <sup>37</sup>Cl-LABELED ANALOGUES**

Lourdes Somoano-Blanco<sup>a</sup>, Pablo Rodríguez-González<sup>a\*</sup>, Sergio García Fonseca<sup>b</sup> and J. Ignacio García Alonso<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>*Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

<sup>b</sup> *ISC-Science, Innovative Solutions in Chemistry, S.L. Edificio Científico-Tecnológico Campus de "El Cristo" 33006, Oviedo, Spain.*

\*Author for correspondence: [rodriguezpablo@uniovi.es](mailto:rodriguezpablo@uniovi.es)

**ABSTRACT**

This work describes the first application of <sup>37</sup>Cl-labeled compounds to isotope dilution mass spectrometry (IDMS). The synthesis of twelve <sup>37</sup>Cl-labeled polychlorinated biphenyls (PCBs) was carried out by the chlorination of biphenyl with isotopically enriched chlorine gas, generated by the direct oxidation of Na<sup>37</sup>Cl with potassium peroxymonosulfate. After an exhaustive purification due to the presence of other congeners the concentration and the isotopic enrichment of all <sup>37</sup>Cl-labeled PCBs in the mixture was determined. The proposed procedure allows the simultaneous quantification of every isotope diluted PCB congener in a single GC-MS/MS injection without resorting to a methodological calibration graph. The results obtained here demonstrate that the use of <sup>37</sup>Cl-labeled analogues provides results in agreement with the certified values of three different Certified Reference Materials (marine sediment SRM 1944, fish tissue 1947 and loamy soil CRM 962-50) and analytical figures of merit comparable to those obtained using regular IDMS procedures based on the use commercially available <sup>13</sup>C-labeled analogues.

**INTRODUCTION**

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are among the 12 persistent organic pollutants (POPs) included in the first list of the Stockholm Convention<sup>1,2</sup>. Since PCBs are fat-soluble and highly chemically stable compounds they persist for a long period of time in the environment and accumulate in biota<sup>3</sup>. A broad spectrum of toxicological properties is

documented for PCBs including dermatological, carcinogenic, immunological, reproductive and neurodevelopmental adversities<sup>4,5</sup>. PCBs were synthesized in large quantities during the last century for many industrial and commercial applications until their manufacture was banned in 1977<sup>6</sup>. However, despite the prohibition of their industrial production and use, they can still be found in the environment. Today it is known that PCBs are distributed at a global scale through atmospheric transport even in remote areas such as the Arctic and the Antarctic<sup>7</sup> and can be found in almost every environmental compartment including air, water, sediments, fish and mammals<sup>8,9</sup>.

For these reasons, the development of reliable methods for PCBs determination in environmental samples is still highly important<sup>10</sup>. The analysis of a solid sample requires the quantitative extraction of all target PCBs from the matrix. This has been carried out during the past years applying different extraction techniques such as soxhlet, microwaves, sonication, supercritical fluid extraction (SFE) or pressurized liquid extraction (PLE)<sup>11-15</sup>. Many of these techniques require long extraction times and/or high amounts of organic solvents and expensive laboratory glassware. Recently, focused microwave technology has been proposed as a rapid and efficient technique capable of providing quantitative extraction of organometallic compounds<sup>16</sup> and Cr(VI)<sup>17</sup> in few minutes using minimal amounts of sample and solvent.

Because of their relatively high volatility, PCBs are mainly determined in real samples using gas chromatography (GC) mainly coupled mass spectrometry (MS)<sup>18</sup>. Electron capture detection (ECD) is employed to a lesser extent as it provides a high sensitivity but suffers from a lack of selectivity due to electronegative interferences or the presence of other matrix halogenated compounds<sup>19</sup>. MS can be employed in combination with electron ionization (EI) or negative chemical ionization (NCI)<sup>20</sup>. The use of NCI provides a higher sensitivity but a more limited selectivity as, similarly than ECD, every chlorine-containing compound is detected. The use of EI increases selectivity as analyte-specific molecular fragments are detected. GC coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) with EI using selected reaction monitoring (SRM) mode enhances the sensitivity and selectivity of PCBs determination compared to selective ion monitoring (SIM)<sup>21-23</sup>.

Using Mass spectrometric detection it is possible to apply isotope dilution mass spectrometry (IDMS) to obtain accurate and precise determinations directly traceable to the International System of units<sup>24</sup>. So far, the determination of PCBs by IDMS has been exclusively carried out using multiply <sup>13</sup>C labeled analogues<sup>25-27</sup>. Regular IDMS approaches in organic analysis require a time-consuming construction of a methodological calibration graph in which different mixtures of the analyte and its labeled analogue must be prepared and analyzed with the isotope diluted samples. When using deuterated compounds isotope effects are more likely to occur due to the higher relative mass difference between <sup>2</sup>H and <sup>1</sup>H than that of <sup>13</sup>C and <sup>12</sup>C or <sup>15</sup>N and <sup>14</sup>N. The stronger binding of <sup>2</sup>H isotopes with carbons compared to <sup>1</sup>H is due to the difference in the length of the C–D and C–H bonds and is one of the reasons of the different retention times commonly observed in chromatographic separations when using deuterated compounds as internal standards.<sup>28,29</sup>

Besides C, H, O and N, many organic compounds are constituted by other elements (heteroatoms) that may contain a low natural abundance isotope which can be employed for isotope labeling. The relative mass difference of the heteroatom employed for labeling is lower than that of C, H, O or N and hence minimize the probability of isotope effects during sample preparation and measurement. The labeling of a molecule in the heteroatom has been traditionally applied mainly in the field of speciation analysis<sup>30</sup>. Most of those applications made use of inductively coupled plasma (ICP) as ion source although some publications using EI have been also reported<sup>31-32</sup>. More recently, heteroatom labeling with enriched stable isotopes has been employed for accurate biomolecule quantification, particularly for the absolute determination of heteroatom-containing proteins via ICP-MS detection<sup>33</sup>. Concerning halogenated compounds <sup>81</sup>Br-labeled analogues have been employed for the determination of polybrominated diphenyl ethers by IDMS<sup>34</sup>. However, although a <sup>37</sup>Cl-labeled tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin standard is commercially available, the use of <sup>37</sup>Cl-labeled compounds has never been described for IDMS. The synthesis of polychlorodibenzofurans<sup>35</sup>, polychlorinated dibenzo-p-dioxins<sup>36</sup>, cis-1-chloro-2-fluoroethylene<sup>37</sup> and Mometasone furoate<sup>38</sup> labeled in <sup>37</sup>Cl has been described but none of these compounds were applied to IDMS. Here, we present for the first time the synthesis, purification and characterization of twelve <sup>37</sup>Cl-labeled PCBs and their application to the analysis of solid matrices by IDMS. We employ GC-MS/MS to

develop a rapid methodology able to quantify all isotope diluted congeners in a single injection without the construction of a methodological calibration graph using minimal amounts of solvent, sample, labeled analogues and glassware.

#### EXPERIMENTAL SECTION

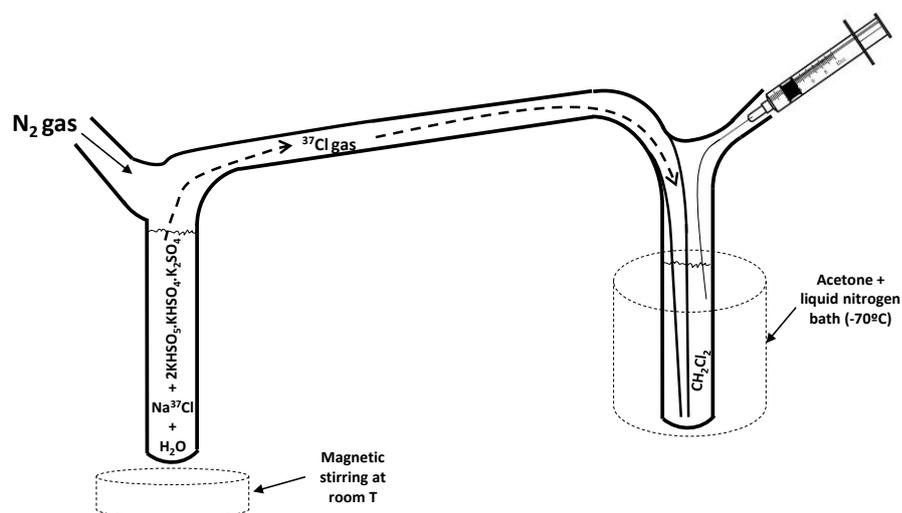
**Reagents and Materials.**  $^{37}\text{Cl}$ -enriched sodium chloride (98.21 %) was purchased from Trace International Sciences (Richmond Hill, ON, Canada). Natural abundance sodium chloride (99.5% purity) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Biphenyl (99.5 % purity), Oxone (potassium peroxymonosulfate), anhydrous aluminium chloride and dichloromethane were purchased from Sigma-Aldrich. Anhydrous sodium sulphate was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Hexane and acetone were obtained from Sigma-Aldrich. Florisil was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). PTFE-coated magnetic stirring bars and 10 mL glass vessels employed for the microwave extractions were purchased from CEM Corporation (Matthews, NC, USA). Individual certified standards of twelve PCBs (congeners 18, 28, 31, 44, 52, 101, 118, 138, 149, 153, 180 and 194) were obtained from Accustandard (New Haven, CT, USA). A  $10\ \mu\text{g g}^{-1}$  PCB Congener Mix of twelve PCBs (congeners 18, 28, 31, 44, 52, 101, 118, 138, 149, 153, 180, 194) was purchased from Sigma-Aldrich. Working standard solutions of labeled and unlabeled PCBs were prepared in isooctane (Sigma-Aldrich) by weight and stored in the dark at  $4^\circ\text{C}$  until use. A  $5\ \mu\text{g mL}^{-1}$  mixture of  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PCBs (congeners 28, 52, 101, 138, 153, 180) was obtained from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). The standard reference materials SRM 1944 (New York/New Jersey Waterway Sediment) and SRM 1947 (Lake Michigan Fish Tissue) were obtained from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA). The certified reference material RTC CRM 962-50 (loamy soil) was purchased from the Laboratory of the Government Chemist (LGC, United Kingdom).

**Instrumentation.** An analytical balance model AB204-S (Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) was used for the gravimetric preparation of all solutions. A mini-vap evaporator/concentrator (Supelco, St. Louis, MO, USA) was used for the evaporation of the samples. The instrumentation required for the synthesis of PCBs consisted of a hot plate RTC Basic (IKA, Staufen, Germany) equipped with a temperature probe, a Dewar (Isotherm, Germany) and a thermometer (ASTM Thermometers, USA). An HPLC

system (Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipped with an analytical-scale fraction collector and a variable wavelength detector was employed for the purification of the  $^{37}\text{Cl}$ -enriched PCBs. Solutions of the crude synthetic mixture (100  $\mu\text{L}$ ) were injected automatically in a Zorbax Eclipse XDB-C18 (9.4 mm, 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) separation column (Agilent Technologies). Determination of the PCBs in the samples was performed with a gas chromatograph model Agilent 7890A (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) fitted with a split/splitless injector and a DB-5MS capillary column (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  film thickness, Agilent technologies). The gas chromatograph was coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole Mass Spectrometer with an electron ionization source. The extraction of the PCBs from the solid sample was carried out by a focused microwave Explorer-12-Hybrid (CEM Corporation). The centrifugation of the samples was performed using a centrifuge model CENTRO-8 BL (JP Selecta, Barcelona, Spain).

#### **Procedures.**

*Synthesis of  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs.* The synthesis of  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs was divided in two parts: the formation of isotopically enriched chlorine gas and the chlorination of biphenyl. The formation of chlorine gas required a special glass device with two reservoirs connected with a tube through which a nitrogen gas stream flows (Figure 1). In the first reservoir 50 mg of  $^{37}\text{Cl}$  enriched NaCl was mixed with 540 mg of potassium peroxymonosulfate and 2 g of Milli-Q water and the mixture was shaken under magnetic stirring at room temperature. After chloride oxidation by potassium peroxymonosulfate, the generated chlorine gas was transported by the nitrogen flow and dissolved in dichloromethane in the second reservoir immersed in a liquid nitrogen and acetone bath at  $-70^\circ\text{C}$ . This reaction required approximately 30 min. For the second step, the dichloromethane containing the isotopically enriched chlorine gas was sampled with a gastight syringe and transferred to another reaction vial where it was mixed with a solution of biphenyl in dichloromethane (containing either 5.5 or 12.5 mg of biphenyl) and with 12 mg of anhydrous aluminium chloride. The mixture was stirred for 6 h at  $40^\circ\text{C}$ . Once the reaction was finished and the mixture reached room temperature, the organic layer was washed three times with water to remove the catalyst and other inorganic impurities. After filtration, it was dried with anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and the organic solvent was evaporated. The target PCB congeners were purified and isolated by semi-preparative HPLC as described in the Supporting information.



**Figure 1.** Glass device employed in this work for the formation of  $^{37}\text{Cl}$  enriched chlorine gas consisting in two reservoirs connected with a tube through which a nitrogen gas stream flows. The first reservoir is kept under magnetic stirring at room temperature and the second reservoir is immersed in liquid nitrogen and acetone bath at  $-70^\circ\text{C}$ .

*Extraction of PCBs from solid samples.* A gravimetrically controlled amount of ca. 0.1 g of sample was directly weighed in a 10 mL microwave glass vessel. Then, 0.3 g of acetone was added and immediately, the sample was spiked with an appropriate amount of the  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs to obtain similar amounts of natural and labeled analogues in the vial. Then, 4 mL of extraction solvent were added and the vial was placed in the microwave system to carry out the extraction. The extraction solvent employed for the sediment and soil reference materials (SRM 1944 and CRM 962) was a 1:1 mixture of hexane and acetone whereas isooctane was employed for the fish tissue reference material (SRM 1947). The microwave assisted extraction of the sample was performed at  $70^\circ\text{C}$  for 4 minutes for sediments and soils (SRM 1944 and CRM 962) and at  $70^\circ\text{C}$  for 8 minutes for the fish tissue (SRM 1947). After extraction, the sample was centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes and the extract was cleaned-up using a florisil column. The florisil column was in-house prepared by adding 0.5 grams into a Pasteur pipette in which glass wool was previously added for sealing. The column was first conditioned with 1 mL of the extraction solvent. Then, 4 mL of sample extractant was added to the column and collected in a 7 mL glass vial. Finally, 1 mL of the extraction solvent was added to the column and collected in the same vial. Just before the GC-MS/MS injection of the samples an additional step of pre-concentration was carried out

in a dedicated unit where the sample was pre-concentrated under a gentle stream of nitrogen until approximately 50  $\mu\text{L}$ . In this way the final solvent prior injection was hexane when analyzing sediments and soils and isooctane when analyzing fish tissues. The SRM transitions for the natural abundance and  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs and the collision energies employed for collision induced dissociation (CID) are given in Table 1. The rest of the experimental parameters are given in Table S1 of the Supporting information.

**Table 1.** GC-MS/MS acquisition parameters employed in SRM mode.

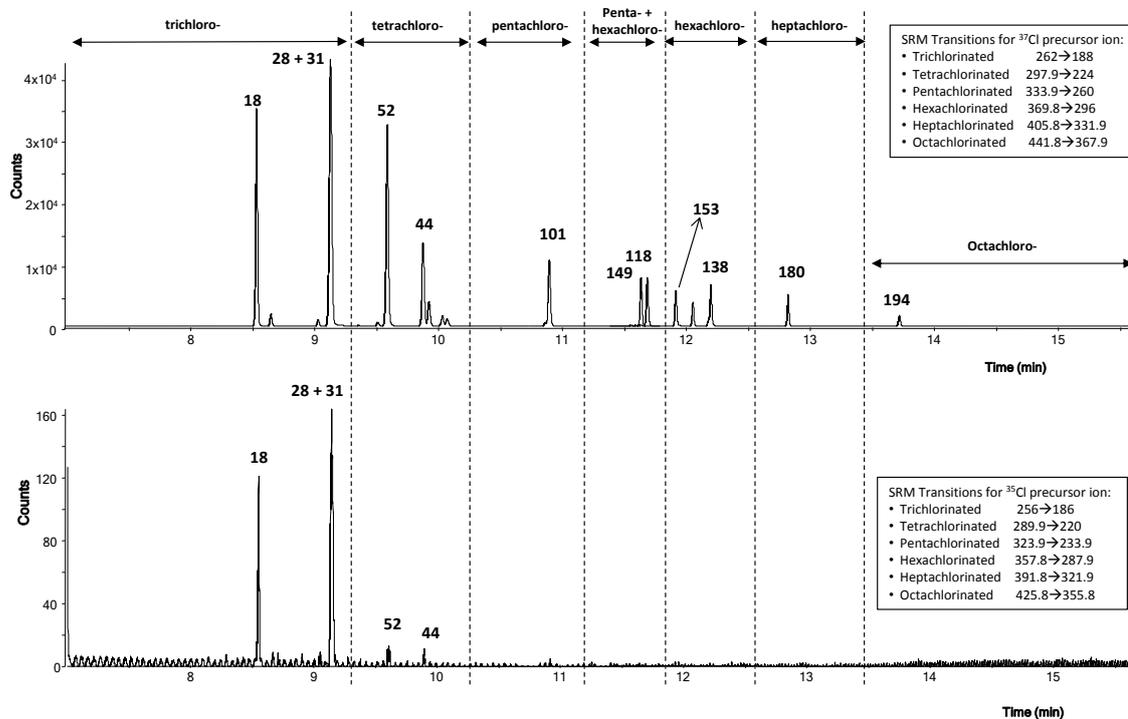
PCBs Group	Collision Energy (V)	Analogue	Precursor Ion formula	Precursor Ion m/z	Product Ion formula	Product Ion m/z
Trichlorinated	28 (PCB-18)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_7^{35}\text{Cl}_3$	256	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_7^{35}\text{Cl}$	186
	26 (PCB-28+31)	Labeled	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_7^{37}\text{Cl}_3$	262	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_7^{37}\text{Cl}$	188
Tetrachlorinated	24 (PCB-52)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_6^{35}\text{Cl}_4$	289.9	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_6^{35}\text{Cl}_2$	220
	26 (PCB-44)	Labeled	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_6^{37}\text{Cl}_4$	297.9	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_6^{37}\text{Cl}_2$	224
Pentachlorinated	28 (PCB-101)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_5^{35}\text{Cl}_5$	323.9	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_5^{35}\text{Cl}_3$	253.9
	32 (PCB-118)	Labeled	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_5^{37}\text{Cl}_5$	333.9	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_5^{37}\text{Cl}_3$	260
Hexachlorinated	32 (PCB-149, PCB-153)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_4^{35}\text{Cl}_6$	357.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_4^{35}\text{Cl}_4$	287.9
	36 (PCB-138)	Labeled	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_4^{37}\text{Cl}_6$	369.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_4^{37}\text{Cl}_4$	296
Heptachlorinated	30 (PCB-180)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_3^{35}\text{Cl}_7$	391.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_3^{35}\text{Cl}_5$	321.9
		Labeled	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_3^{37}\text{Cl}_7$	405.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_3^{37}\text{Cl}_5$	331.9
Octachlorinated	28 (PCB-194)	Natural	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}_8$	425.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_2^{35}\text{Cl}_6$	355.8
		Labeled	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_2^{37}\text{Cl}_8$	441.8	$^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_2^{37}\text{Cl}_6$	367.9

*Determination of PCBs using  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled analogues.* The quantification of PCBs in the samples using commercially available  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled analogues was carried out resorting to a methodological calibration graph prepared with defined mixtures of natural and labeled PCBs in a concentration range from 20  $\text{ng g}^{-1}$  to 250  $\text{ng g}^{-1}$ . The concentration of the  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PCBs in the calibration mixtures was approximately 50  $\text{ng g}^{-1}$ . The samples were spiked with the  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PCBs, extracted by focused microwaves as described previously and the samples were measured using the SRM mode. The SRM transitions for the natural abundance PCBs and the collision energy were the same as those reported in Table 1. However, the SRM transitions for the labeled analogues were 268.0 $\rightarrow$ 198.0, 302.0 $\rightarrow$ 232.0, 335.9 $\rightarrow$  266.0, 371.8 $\rightarrow$ 301.9, 405.8 $\rightarrow$ 335.9 for , tri-, tetra-, penta-, hexa- and heptachlorinated PCBs, respectively.

**RESULTS AND DISCUSSION**

**Optimization of  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs synthesis conditions.** The objective of the synthesis was the production of a mixture containing a set of twelve PCB congeners. This mixture included the six non-dioxin-like PCBs congeners 28, 52, 101, 138, 153 and 180 that are considered as indicators by the EFSA (European Food Safety Authority), the 'dioxin-like' congener PCB 118, to which a toxic equivalency factor has been assigned by the World Health Organization, and five other congeners relevant due to their presence in the environment (18, 31, 44, 149 and 194). This group of congeners is listed in the International Standard IEC 61619-1997 for the determination of PCBs by capillary GC in insulating liquids. The synthesis of  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs consisted in the oxidation of the chloride to chlorine and the subsequent electrophilic substitution of chlorine in the biphenyl aromatic rings. Preliminary experiments using natural abundance NaCl showed that obtaining all target PCBs in a single synthesis reaction was not possible. This was due to the strong correlation between the biphenyl amount and the final chlorination degree of the obtained PCB congeners. As expected, low amounts of biphenyl led to high chlorination degrees whereas higher amount of biphenyl decreased the chlorination degree. Previous experiments using natural abundance NaCl were carried out using different biphenyl amounts (from 3.7 to 40 mg). Based on those results we finally selected two different amounts of biphenyl: i) one reaction employing 12.5 mg of biphenyl to mostly obtain tri-, tetra- and pentachlorinated PCBs and ii) another reaction employing 5.5 mg of biphenyl to mostly obtain hexa-, hepta and octachlorinated PCBs. Figure S1 of the Supporting information shows a GC-MS chromatogram for each synthesis crude in which the target congeners are highlighted. As can be observed, besides the target congeners there is an important presence of other congeners in both crudes. Therefore, an exhaustive isolation and purification of the target compounds by semi-preparative liquid chromatography was required. Figure S2 shows the HPLC-UV chromatograms obtained for each of the synthesis crudes. Congeners 18, 28, 31, 44, 52, 101 and 118 were isolated from the less chlorinated synthesis crude whereas congeners 138, 149, 153, 180 and 194 were isolated from the more chlorinated crude synthetic mixtures. Figure 2 shows a GC-MS/MS chromatogram of the final mixture of the  $^{37}\text{Cl}$ -enriched target PCB after isolation and purification. As can be observed, the intensity of the SRM transitions corresponding to the  $^{35}\text{Cl}$ -precursor ions is negligible in comparison with those of  $^{37}\text{Cl}$ -precursor ions. Figures S3, S4, S5, S6, S7 and S8 of the Supporting Information show

the GC-MS spectra obtained in SCAN mode of several natural abundance and  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCB congeners. As can be observed, all labeled analogues are highly enriched in  $^{37}\text{Cl}$ .



**Figure 2.** GC-MS/MS chromatogram of a  $100 \text{ ng g}^{-1}$  solution of the  $^{37}\text{Cl}$ -enriched target PCBs mixture after isolation and purification. The upper chromatogram shows the SRM transitions for the  $^{37}\text{Cl}$  precursor ion whereas the lower chromatogram shows the SRM transitions for the  $^{35}\text{Cl}$  precursor ion.

**Characterization of  $^{37}\text{Cl}$ -Labeled PCBs.** The isotopic enrichment of the labeled PCBs was calculated following the procedure described elsewhere<sup>39</sup>. A different enrichment was obtained depending on the synthesis crude. Table S2 shows that the PCB congeners obtained from the less chlorinated crude presented an enrichment from 93.99% to 94.16% whereas those obtained from the more chlorinated crude present a lower enrichment from 91.45 to 92.70%. The concentration of the  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs in the mixture was determined by reverse IDMS using natural abundance certified standards. For this purpose, three independent mixtures of natural abundance PCBs solution and the  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs solution were injected in triplicate in the GC-MS/MS system. This experiment was repeated seven times over a period of 6 months to study the chemical stability of the  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs in the stock solution. Figure S9 shows that the PCBs concentration was constant during this period of time and Table S2 shows the

average and standard deviation of all reverse IDMS determinations. The RSD obtained over 6 months was lower than 7%, indicating a satisfactory stability over this time period.

#### **Determination of PCBs by IDMS and GC-MS/MS using $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues.**

For all congeners the loss of two chlorine atoms was the most favored reaction occurring during CID. An important aim of this work was the development of a measurement procedure allowing the direct quantification of all target PCBs in a single GC-MS/MS injection without resorting to an IDMS calibration graph. For this purpose, we had to select precursor ions corresponding to a single isotopologue and leading to a single product ion after CID. Thus, we selected for natural abundance PCBs the precursor ions corresponding to the isotopologues containing all  $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  and  $^{35}\text{Cl}$  ( $^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_x^{35}\text{Cl}_y$ , where  $x+y=10$ ) and for the labeled congeners the isotopologues containing all  $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  and  $^{37}\text{Cl}$  ( $^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_x^{37}\text{Cl}_y$ , where  $x+y=10$ ). The contribution of isotopologues containing  $^{35}\text{Cl}$  in the  $m/z$  of  $^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_x^{37}\text{Cl}_y$  can be assumed to be negligible as this would require the presence of two  $^{13}\text{C}$  or two  $^2\text{H}$  atoms. The formula and the  $m/z$  of the precursor and product ions for each group of PCBs are given in Table 1. As can be observed, the only difference between the product ion structure for natural and labeled analogues is the identity of the chlorine isotope. The mathematical calculation employed here to obtain the PCBs concentration for each congener is given in Equation [1] where the intensities of the two SRM transitions measured are expressed as a linear combination of the theoretical abundances of the  $^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_x^{35}\text{Cl}_y$  and  $^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_x^{37}\text{Cl}_y$  precursor ions. Equation [1] provides the molar fractions of natural abundance and labeled PCB ( $X_{\text{nat}}$  and  $X_{\text{lab}}$ , respectively).

$$\begin{bmatrix} I_{exp}^{35} \\ I_{exp}^{37} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{35} & A_{lab}^{35} \\ A_{nat}^{37} & A_{lab}^{37} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} \quad [1]$$

As the number of moles of the labeled PCB added at the beginning of the sample preparation is known, the number of moles of the natural abundance PCB can be obtained from the ratio of molar fractions as described in equation [2].

$$\frac{X_{nat}}{X_{lab}} = \frac{n_{nat}}{n_{lab}} \quad [2]$$

**Optimization of sample preparation procedure.** The acquisition strategy explained above allowed us to perform direct quantifications of all PCBs in a single sample avoiding a methodological calibration. Thus, the measurement time and the required amount of labeled analogue were significantly reduced in comparison with regular IDMS procedures. To further decrease the total analysis time we pursued the development of a fast sample preparation and clean-up procedures. Focused microwaves were employed to perform a fast extraction of the PCBs from the solid samples while using minimal amounts of sample, solvent and laboratory glassware. The first experiments were carried out with the certified sediment SRM 1944 using 0.1 g of sample and 4 mL of solvent. Toluene and a 1:1 mixture of hexane and acetone were compared using 70°C during 4 minutes. Such extraction conditions were previously employed for the extraction organometallic contaminants in solid matrices<sup>16</sup>. Toluene was chosen for this comparison due to its high boiling point to minimize losses due to the solvent evaporation. Figure S10 of the Supporting Information shows that, for most congeners, better extraction efficiencies were obtained when using the mixture of hexane and acetone, providing concentration values in agreement with the certified values. The recovery range obtained using the 1:1 mixture of hexane and acetone was 93-112% whereas when using toluene the range was 83-99%. The reproducibility range obtained for the SRM 1944 ranged from 0.5 to 12% when using the 1:1 mixture of hexane and acetone and from 0.5 to 5% RSD when using Toluene. Concerning the extraction of PCBs from biological samples a careful optimization of the extraction conditions was carried out with the certified fish tissue SRM 1947 using the same amount of sample and solvent as that employed for sediment samples. Figure S11a of the Supporting Information shows that for this type of sample the 1:1 hexane acetone mixture provided poor recoveries and a poor reproducibility. The recovery range obtained for this solvent was from 75 to 135% and the reproducibility range was from 3 to 43% RSD obtained from three different measurement days. According to these results, this solvent mixture was discarded for future experiments with biotissues. Figure S11b shows the results obtained when using only hexane. The recoveries obtained using hexane ranged from 83 to 102% while the reproducibility between three different measurement days ranged from 2 to 9%. Similar results were obtained when using isooctane: recoveries from 82 to 104% and reproducibility from 2 to 14%. Finally, isooctane was chosen for further experiments as, due to its higher boiling point in comparison with hexane, it was possible to minimize the risk of solvent evaporation

during the focused microwave extraction. After extraction and centrifugation of the extract we employed a simple clean-up procedure using a home-made florisil column to remove polar compounds. Then, just before the injection in the GC-MS/MS we pre-concentrated the extract with a gentle stream of nitrogen to a few microliters. A GC-MS/MS chromatogram of the certified sediment SRM 1944 treated as described previously is given in Figure S12. As can be observed, the chromatographic peaks of the target PCB congeners, highlighted in the chromatogram, can be easily integrated without interferences from the sample matrix.

**Table 2.** Results obtained in the analysis of the certified reference materials SRM1944, SRM 1947 and CRM 962 using the proposed methodology. Uncertainty of the values corresponds to the 1s standard deviation of n=3 independent extractions.

Congeners	SRM 1944 Sediment		SRM 1947 Fish Tissue		CRM 962 Loamy sand	
	Certified values (ng g <sup>-1</sup> )	Experimental values (ng g <sup>-1</sup> )	Certified values (ng g <sup>-1</sup> )	Experimental values (ng g <sup>-1</sup> )	Certified values (ng g <sup>-1</sup> )	Experimental values (ng g <sup>-1</sup> )
PCB-18	51.0 ± 2.6	52.2 ± 3.0	2.72 ± 0.95	2.55 ± 0.14	-	-
PCB-28					168 ± 52.1	135.2 ± 3.7
PCB-28+31	159.5 ± 4.3	149.4 ± 7.9	24.5 ± 2.4	21.9 ± 1.3		
PCB-52	79.4 ± 2.0	78.3 ± 3.8	36.4 ± 4.3	36.9 ± 2.1	164 ± 27.5	183.2 ± 5.2
PCB-44	60.2 ± 2.0	61.2 ± 2.6	20.4 ± 1.7	20.0 ± 1.4	-	-
PCB-101	73.4 ± 2.5	68.0 ± 3.3	90.8 ± 0.3	89.4 ± 5.4	117 ± 36.9	111.6 ± 3.2
PCB-118	58.0 ± 4.3	54.2 ± 2.7	112.0 ± 6.0	108.7 ± 5.3	156 ± 6.76	174.7 ± 4.2
PCB-149	49.7 ± 1.2	50.7 ± 2.9	67.1 ± 3.7	67.0 ± 3.6	-	-
PCB-153	74.0 ± 2.9	79.0 ± 3.5	201.0 ± 3.0	198.7 ± 10.3	207 ± 64.1	200.9 ± 4.8
PCB-138	62.1 ± 3.0	59.9 ± 1.5	162.0 ± 6.9	155.8 ± 9.6	249 ± 80.5	257.1 ± 9.0
PCB-180	44.3 ± 1.2	43.8 ± 1.7	80.8 ± 5.0	81.3 ± 4.1	274 ± 54.8	252.4 ± 7.0
PCB-194	11.2 ± 1.4	10.5 ± 0.8	-	-	-	-

**Analysis of Certified Reference Materials.** Table 2 shows the results obtained in the analysis of three different certified reference materials (sediment SRM 1944, Fish Tissue SRM 1947, and loamy sand CRM 962) under the optimized conditions. For all materials n=3 independent extractions were performed and each extracted sample was injected in triplicate. As can be observed in Table 2 all the target PCB congeners were quantified in agreement with the certified value for the three materials except for PCB-118 in the CRM962. Recovery values ranged from 93% to 107% for sediment SRM 1944, from 89 to 101% for SRM 1947 and from 80% to 112% for CRM 962. The

reproducibility obtained expressed as RSD(%) ranged from 2.5% to 7.6% for sediment SRM 1944, from 4.9% to 7% for SRM 1947 and from 2.4% to 3.5% for CRM 962.

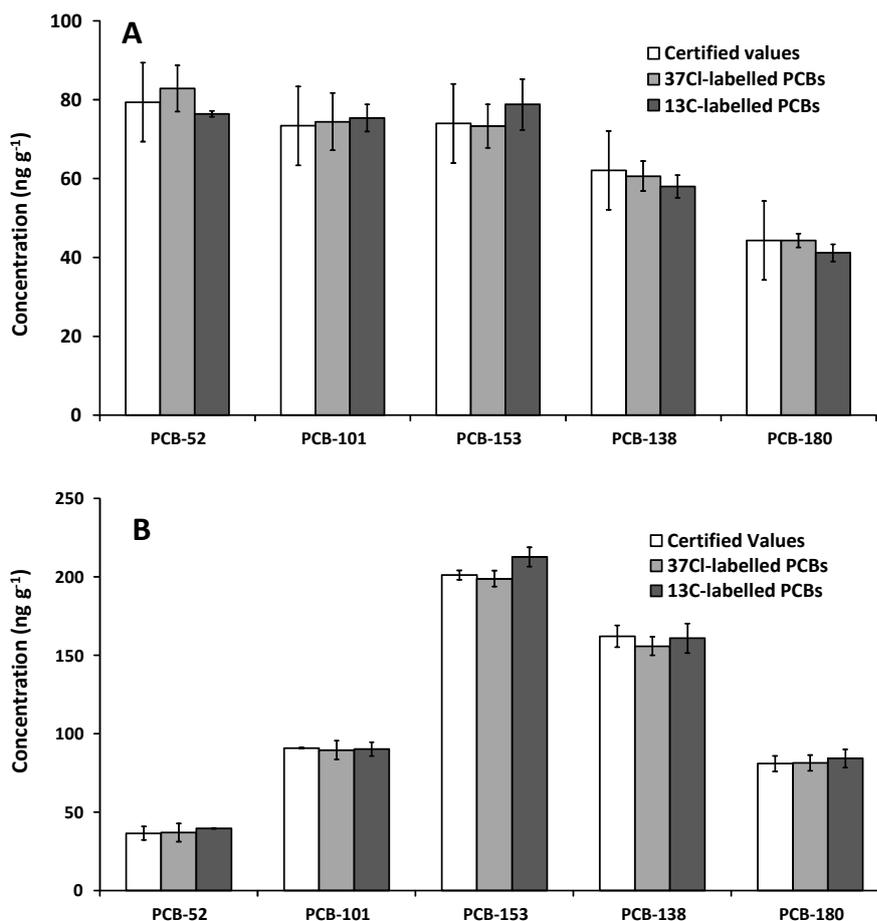
#### **Blank values and detection limits**

Blank values were calculated by IDMS by spiking a blank with an approximate amount of 0.07 ng of each  $^{37}\text{Cl}$ -enriched PCBs. For this purpose, 0.1 g of a  $0.7 \text{ ng g}^{-1}$  solution of the  $^{37}\text{Cl}$ -enriched PCBs was added to the blank. Six independent blanks were submitted to the whole sample preparation procedure in two different measurement days and the results obtained were expressed relative to the average sample weight of each measurement day. Table S3 shows the blank values obtained and the resulting limits of detection for the target congeners. Uncertainty of each replicate is expressed as 1s standard deviation of  $n=3$  independent GC-MS/MS injection. Due to the very low level of PCB-180 and PCB-194 in the blanks we could not provide any blank value and limit of detection for these congeners. Overall, Table S3 shows that the limit of detection of the method is lower than  $1 \text{ ng g}^{-1}$  for all target congeners.

#### **Comparison of $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs with $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PCBs.**

The proposed methodology based in the use of  $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues and equations [1] and [2] was compared with the regular IDMS procedure based on the construction of a methodological calibration graph and the use of commercial available multiply  $^{13}\text{C}$ -labeled analogues. The SRM acquisition parameters employed for the regular IDMS procedure are given in the experimental section. Both strategies were compared for the analysis of sediment SRM1944 and fish tissue SRM1947 using the previously optimized extraction procedures. The comparison was carried out in the same measurement days for congeners 52, 101, 153, 138 and 180 as they were the only  $^{13}\text{C}$ -labeled analogues commercially available. Figure 3 shows the results obtained for both materials and the comparison with the certified values. As can be observed, both strategies provided experimental concentrations in agreement with the certified values for all studied congeners. For the sediment SRM 1944 the recoveries obtained ranged from 98 to 104% using  $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues and from 93 to 106% using  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled analogues. The repeatability obtained in this material expressed as the relative standard deviation from  $n=3$  independent extractions ranged from 4 to 10% using  $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues and from 1 to 8% using  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled analogues. Concerning the fish tissue

SRM1947 the recoveries obtained ranged from 96 to 101% using  $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues and from 99 to 109% using  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled analogues. The repeatability obtained in this material expressed as the relative standard deviation from  $n=3$  independent extractions ranged from 3 to 16% using  $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues and from 1 to 7% using  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled analogues. Overall a better repeatability was obtained when using the  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled analogues whereas a better agreement with the certified values was obtained using the  $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues.



**Figure 3.** Comparison of the experimental concentrations obtained for PCB-52, 101, 153, 138 and 180 by the proposed methodology using  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs with those obtained by a regular IDMS procedure using  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled PCBs in the analysis of A) the certified reference sediment SRM 1944 and B) the certified reference fish tissue SRM 1947. Error bars of the experimental values correspond to the 1s standard deviation of three independent extractions.

**CONCLUSIONS**

This paper described the first application of  $^{37}\text{Cl}$ -labeled compounds to IDMS. We have synthesized and characterized a mixture of  $^{37}\text{Cl}$ -enriched PCBs to develop a SI traceable procedure for the quantification of a set of PCB congeners in solid samples. The results obtained in this work demonstrate that the quantification strategy based on the use of  $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues, focused microwaves, GC-MS/MS and equations [1] and [2] provides accurate and precise determinations of PCBs in three different Certified Reference Materials (sediments, soils and fish tissues) without resorting to a methodological calibration graph. The results obtained demonstrate that the use of  $^{37}\text{Cl}$ -labeled analogues provide analytical figures of merit comparable to those obtained using regular IDMS procedures based on the use commercially available  $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled analogues and the construction of a methodological calibration graph. However, the construction of the calibration graph requires a longer analysis time and the consumption of higher amounts of expensive labeled material. In addition, the proposed sample preparation procedure based on focused microwaves requires minimal amount of sample, solvent and laboratory glassware and allows a rapid determination of the analytes as the extraction procedure is carried out in less than 10 minutes and the clean-up step is a simple purification with a home-made Florisil columns.

**AKNOWLEDGEMENTS**

Financial support from FICYT (Asturias) in the frame of the PCTI and FEDER programs through project PC10-49 is acknowledged. Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through Projects CTQ2009-12814 and CTQ2012-36711 (cofounded by FEDER) are also acknowledged. The UE is acknowledged for the provision of FEDER funds for the purchase of the GC-MS/MS instrument. P. Rodríguez-González acknowledges his research contract RYC-2010-06644 to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the Ramón y Cajal Program.

**SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE**

This information is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org/>.

**REFERENCES**

- [1]. Rodan, B.D.; Pennington, D.W.; Eckley, N.; Boethling, R. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3482-3488.

- [2] Wania, F.; Mackay, D. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 9, 390-396.
- [3] Kannan, K.; Nakata, H.; Stafford, R.; Masson, G.R.; Tanabe, S.; Giesy, J.P. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 1214-1221.
- [4] Carpenter, D.O. *Rev. Environ. Health.* **2006**, *21*, 1-23.
- [5] Ross, G. *Ecotox. Environ. Safe.* **2004**, *59* 275–291.
- [6] Kelly, K.J.; Connelly, E.; Reinhold, G.A.; Byrne, M.; Prezant, D.J. *Arch. Environ. Health* **2002**, *57*, 282-293.
- [7] Choi, S.D.; Baek, S.Y.; Chang, Y.S; Wania F.; Ikonomou M.G.; Yoon Y.J.; Park, B.K.; Hong, S. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 7125–7131.
- [8] Beyer, A.; Biziuk, M. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2009**, *201*, 137-158.
- [9] Jaraczewska, K.; Lulek, J.; Covaci, A., Voorspoels, S. Kaluba-Skotarczak A.; Drews K.; Schepens, P. *Sci. Total Environ.* **2006**, *372* ,20–31
- [10] Tang, H.P. *TRAC-Trend. Anal. Chem.* **2013**, *45*, 48-66.
- [11] Xu W.; Wang, X.; Cai, Z. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *790*, 1-13.
- [12] Wang, P.; Zhang, Q.; Wang, Y.; Wang, T.; Li, X.; Ding, L.; Jiang, G. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, *663*, 43-48.
- [13] Carro, A.; Lorenzo, R.; Fernández, F.; Phan-Tan-Luu, R.; Cela, R. *Anal Bioanal Chem.* **2007**, *388*, 1021-1029.
- [14] Yarita, T.; Aoyagi, Y.; Numata, M.; Takatsu, A. *Analytical Sciences.* **2006**, *22*, 1449-1454.
- [15] Suchan, P.; Pulkrabová, J.; Hajslová, J.; Kocourek, V. *Analytica Chimica Acta.* **2004**, *520*, 193-200.
- [16] Pacheco-Arjona, J.; Rodríguez-Gonzalez, P.; Valiente, M.; Barclay, D.; Donard, O.F.X. *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* **2008**, *88*, 923-932.
- [17] Fabregat-Cabello, N.; Rodríguez-González, P.; Castillo, A.; Malherbe, J. Roig-Navarro, A.F.; Long, S.E.; García Alonso, J.I. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46*, 12542–12549.
- [18].Van Leeuwen, S.P.J.; Van Bavel, B.; DeBoer, J. *TRAC-Trend Anal. Chem.* **2013**, *46*, 110-117.
- [19] Danielsson, C.; Wiberg, K.; Korytár, P.; Bergek, S.; Brinkman, U.A.T.; Haglund, P. *J. Chromatogr. A* **2005**, *1086*, 61–70
- [20] Dmitrovic, J.; Chan, S.C. *J. Chromatogr. B* **2002**, *778*, 147–155.
- [21] Plaza Bolaños P., Garrido Frenich A.; Martínez Vidal. J.L. *J. Chromatogr. A*, **2007**, *1167*, 9–17.

- [22] Kalachova, K.; Pulkrabova, J.; Cajka, T.; Drobova, L.; Stupak, M.; Hajslova, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 7803-7815.
- [23] Lin, Y.; Pessah, I. N.; Puschner, B. *Talanta*. **2013**, 113, 41-48.
- [24] García Alonso, J. I.; Rodríguez-Gonzalez, P. "Isotope Dilution Mass Spectrometry". Royal Society of Chemistry, 2013, Cambridge (UK)
- [25] Focant, J.F.; Sjödin, A.; Turner, W.E.; Patterson, D.G.. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 6313-6320
- [26] Takasuga, T.; Senthilkumar, K.; Matsumura, T.; Shiozaki K.; Sakai, S. *Chemosphere* **2006**, 62, 469-484.
- [27] Otake, T.; Aoyagi, Y.; Yarita, T. Numata, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 397, 2569-2577.
- [28] Stokvis, E; Rosing, H; Beijnen, J.H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19, 401-407.
- [29] Itoh, N.; Numata, M.; Aoyagi, Y.; Yarita, T. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1138, 26-31
- [30] Rodríguez-Gonzalez, P.; García Alonso, J. I. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2010**, 25, 239-259.
- [31] Bancon-Montigny, C.; Maxwell, P.; Yang, L.; Mester, Z.; Sturgeon, R.E. *Anal. Chem.* **2002**, 74: 5606-5613.
- [32] Centineo, G.; Rodríguez-González, P.; Blanco, E.; García Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A. *J. Mass Spectrom.* **2004**, 39: 485-494.
- [33] Bettmer, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 397: 3495-3502
- [34] González-Gago, A.; Marchante-Gayon, J.M.; Ferrero, M.; García Alonso J.I. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 3024-3032.
- [35] Yoon-Seok, C.; Deinzer, M.L. *J. Labeled Compd. Radiopharm.* **1991**, 29, 43-62.
- [36] Mahiou, B.; Deinzer, M.L. *J. Labeled Compd. Radiopharm.* **1992**, 31, 261-287.
- [37] Baldan, A. *Synth. Commun.* **2004**, 34, 1229-1235.
- [38] Wadsworth, A.H.; Montgomery, S.; lawrie, K.W.M.; Carr, R.M. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **2007**, 50, 471-472.
- [39] González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; García Alonso, J.I. *J. Mass Spectrom.* **2014**, 49, 681-691.

## SUPPORTING INFORMATION

**DETERMINATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN SOLID SAMPLES BY ISOTOPE DILUTION MASS SPECTROMETRY USING <sup>37</sup>Cl-LABELED ANALOGUES**

Lourdes Somoano Blanco, Pablo Rodriguez Gonzalez\*, J. Ignacio Garcia Alonso.

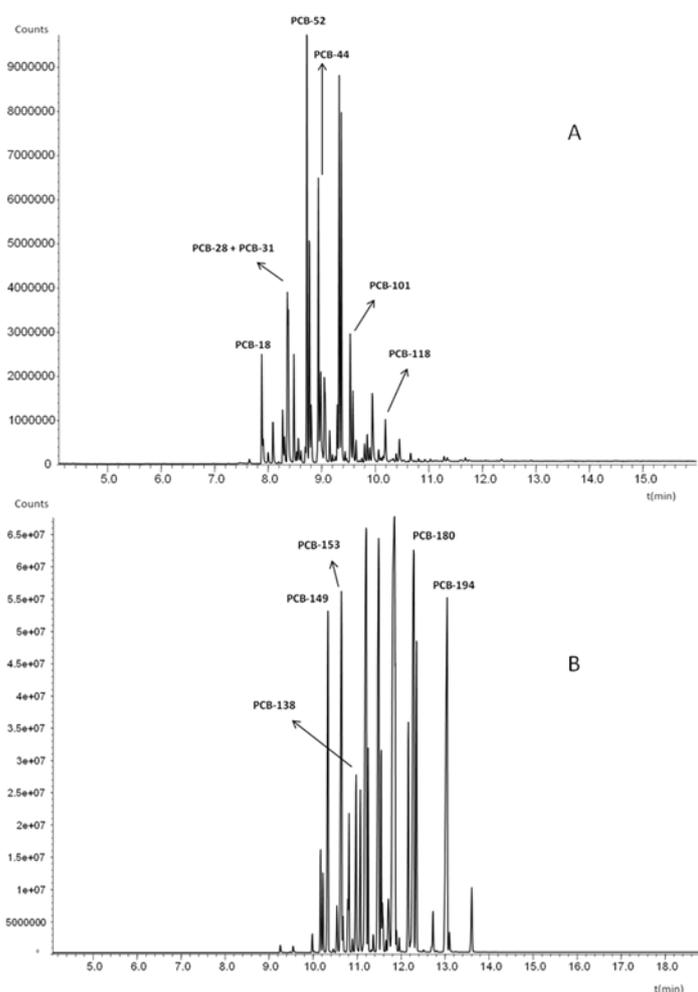
*Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

\*Author for correspondence: [rodriguezpablo@uniovi.es](mailto:rodriguezpablo@uniovi.es)

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Table S1.** Experimental parameters employed for GC-MS/MS measurements.

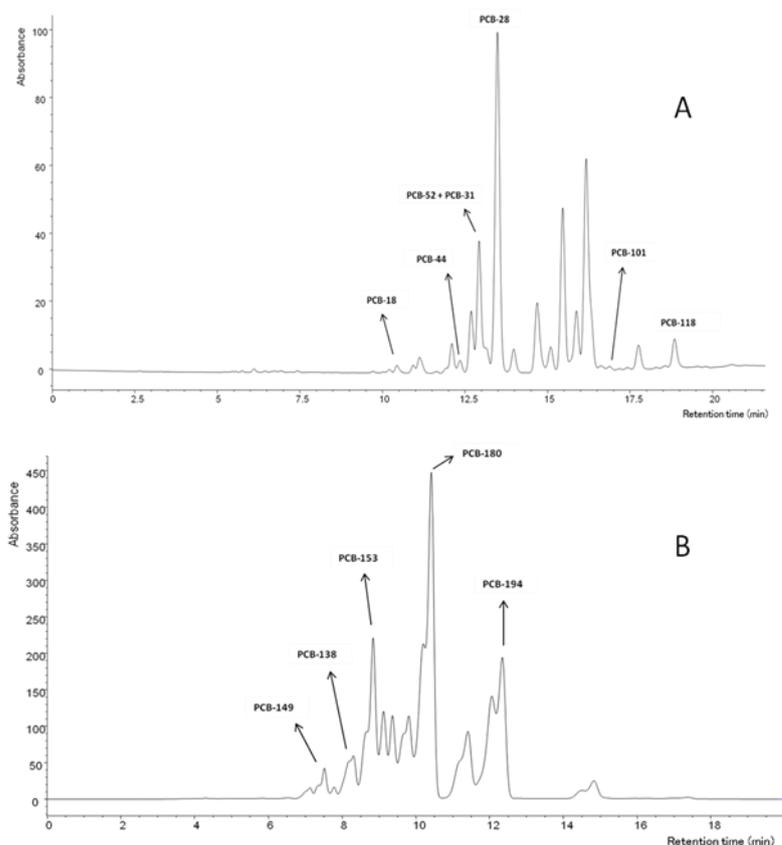
<b>CHROMATOGRAPHIC PARAMETERS</b>	
<b>Chromatograph</b>	7890A Agilent Technologies
<b>Column</b>	DB-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 0.250 µm coating)
<b>Carrier gas</b>	He (2 mL/min)
<b>Injection mode</b>	Splitless (2 min of purge time)
<b>Injector temperature</b>	280°C
<b>Temperature program</b>	From 80°C (1min) 220°C (0 min) at 20°C/min 232°C (0 min) at 5°C/min 300°C (3 min) at 30°C/min
<b>DETECTOR PARAMETERS</b>	
<b>Detector</b>	Agilent 7000
<b>Ionization current</b>	35 µA
<b>Ionization energy</b>	70 eV
<b>Source temperature</b>	230°C
<b>Interface temperature</b>	280°C
<b>Dwell time</b>	100 ms

Synthesis of the  $^{37}\text{Cl}$ -enriched PCBs

**Figure S1.** GC-MS chromatogram of A) the less chlorinated synthesis crude obtained when using 12.5 mg of biphenyl and B) the highly chlorinated synthesis crude obtained when using 5.5 mg of biphenyl.

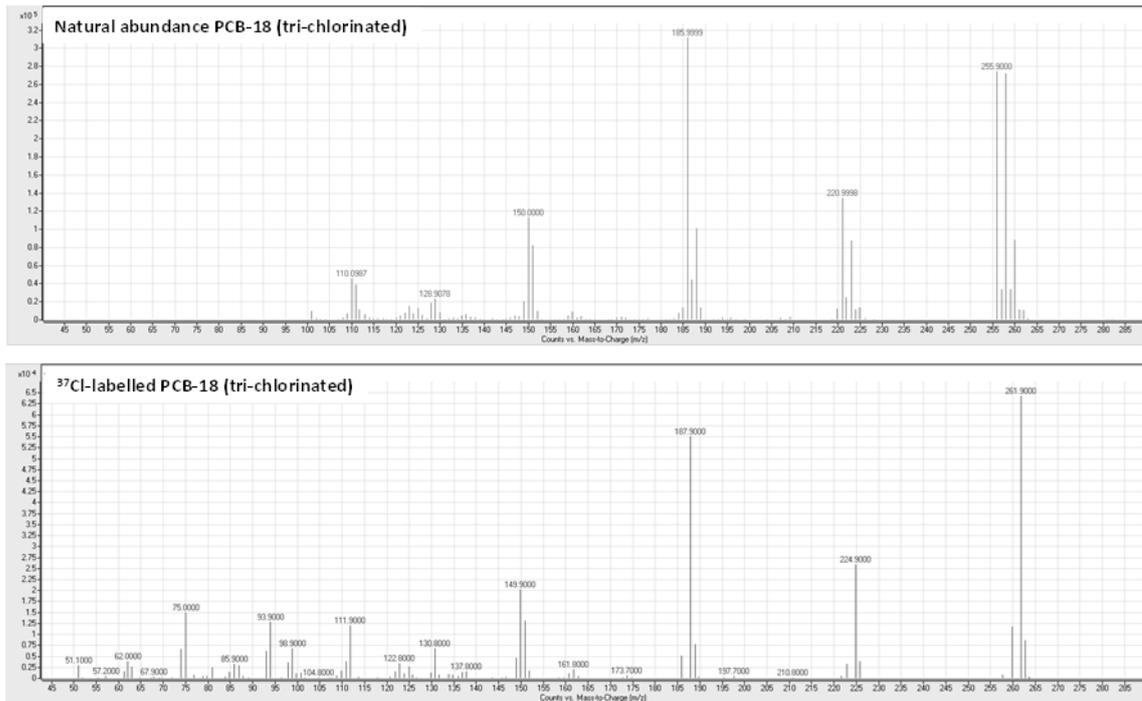
**Isolation and purification of the of the  $^{37}\text{Cl}$ -enriched PCBs.**

The HPLC instrumental system was equipped with a Zorbax Eclipse XDB-C18 (9.4 mm, 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) separation column. The column flow and the wavelength for UV detection were set at 2.5 mL/min and 254 nm, respectively. A volume of 100  $\mu\text{L}$  of both synthesis crudes was injected in the system and the fractions corresponding to the twelve target congeners were collected using an analytical-scale fraction collector. Figure S2 shows the resulting HPLC-UV chromatograms of both synthesis crudes. Similarly than Figure S1, Figure S2 also shows that a high number of PCBs congeners were synthesized in both crudes.

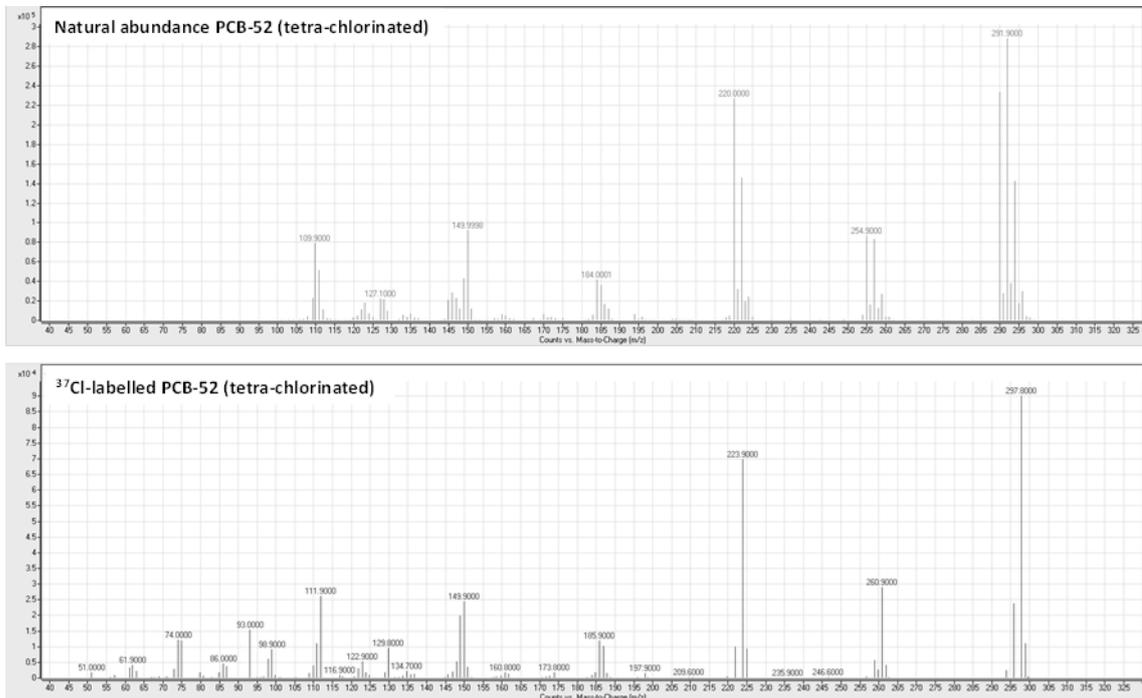


**Figure S2.** HPLC-UV Chromatograms of A) the less chlorinated synthesis crude obtained when using 12.5 mg of biphenyl using a mobile phase of 80% ACN and 20% H<sub>2</sub>O and B) the highly chlorinated synthesis crude obtained when using 5.5 mg of biphenyl using 100% ACN as mobile phase.

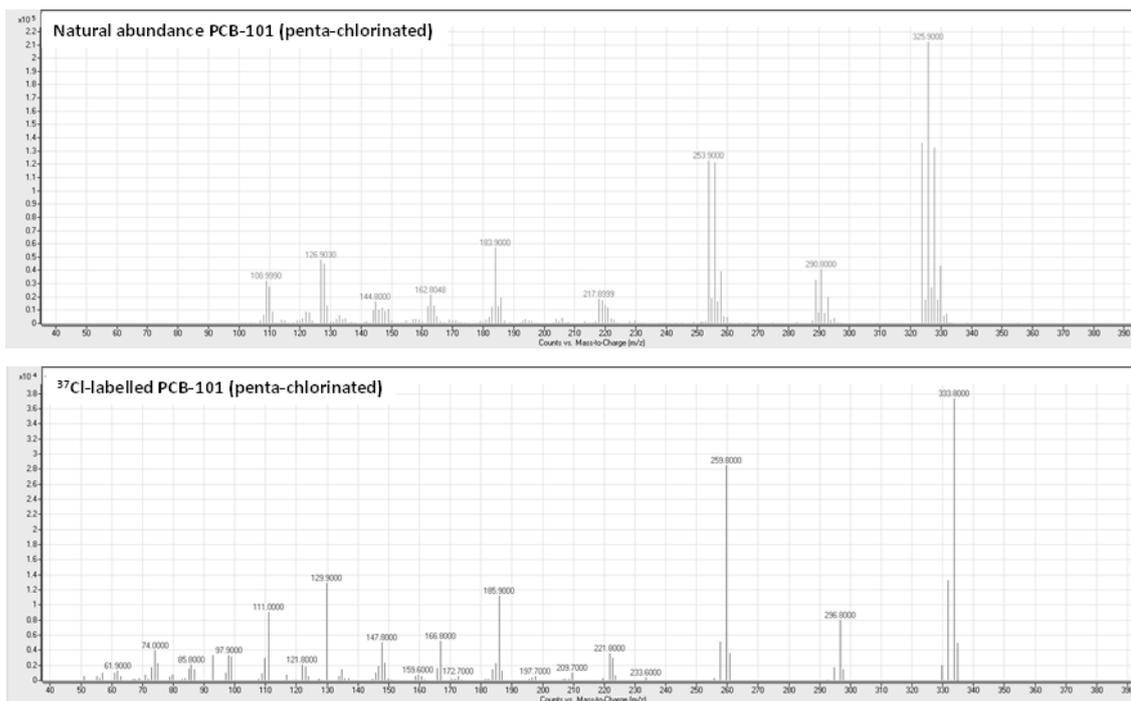
After the identification of the target PCBs by the retention times injecting individual natural abundance standards, the collection time window for each fraction was defined for each of the target PCBs. Then these fractions were injected in a GC-MS system in Scan mode in order to identify all co-eluting PCBs in each fraction. For some congeners, a second HPLC separation using a different mobile phase composition and the subsequent GC-MS analysis was required. After a successful purification of the twelve target PCBs, we prepared a mixture containing the twelve congeners to be used in further experiments for the analysis of the samples.



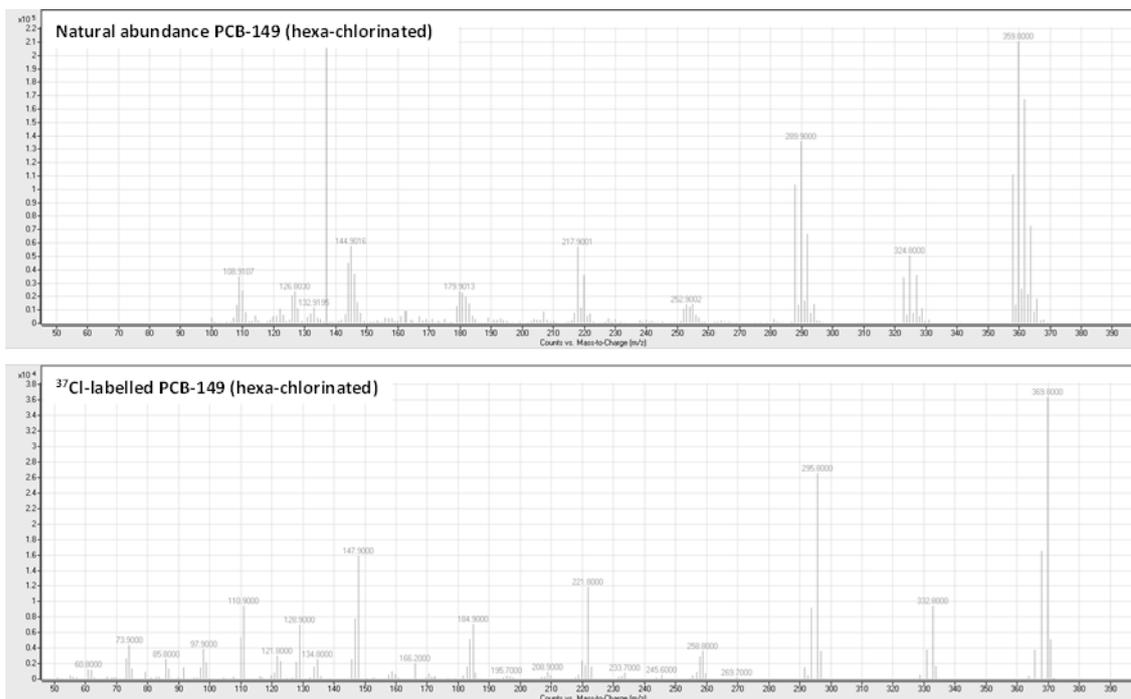
**Figure S3.** Comparison of the GC-MS mass spectra obtained in SCAN mode of the tri-chlorinated natural abundance and the  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCB 18.



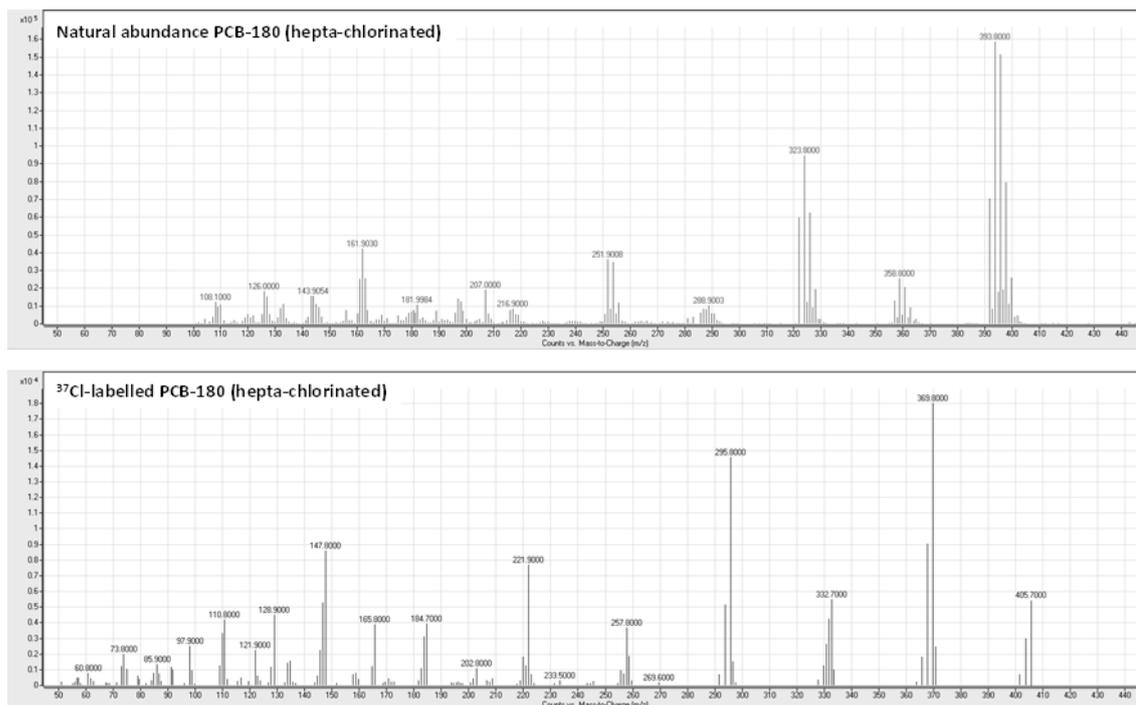
**Figure S4.** Comparison of the GC-MS mass spectra obtained in SCAN mode of the tetra-chlorinated natural abundance and the  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCB 52.



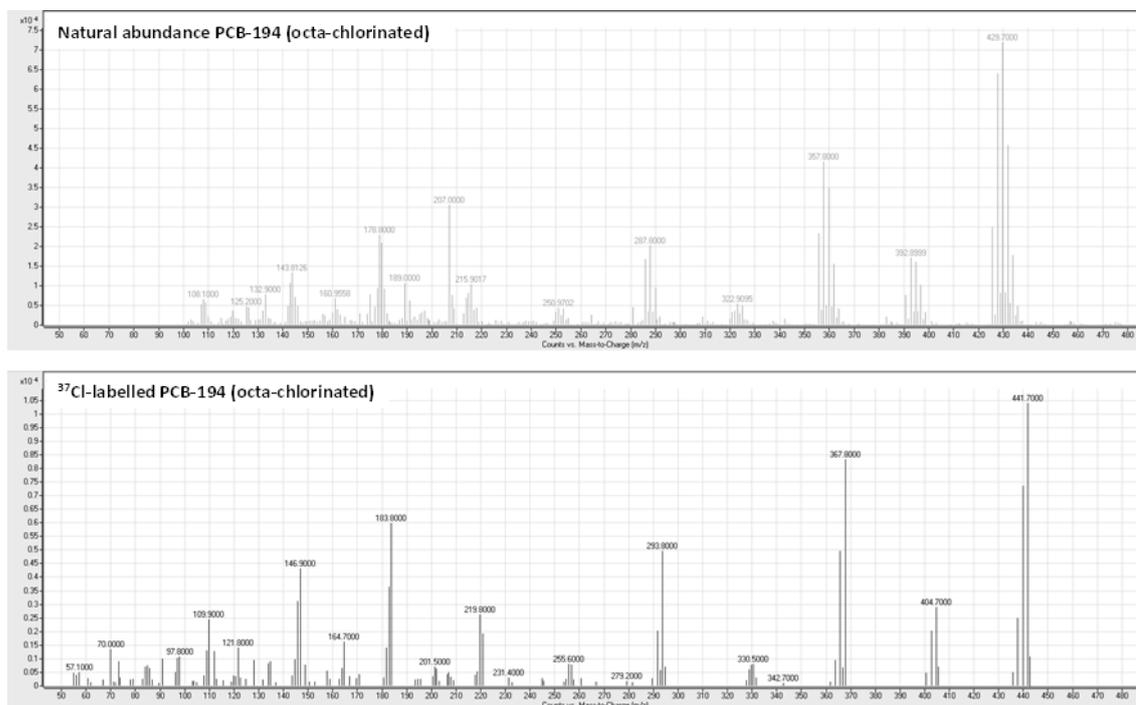
**Figure S5.** Comparison of the GC-MS mass spectra obtained in SCAN mode of the penta-chlorinated natural abundance and the  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCB 101.



**Figure S6.** Comparison of the GC-MS mass spectra obtained in SCAN mode of the hexa-chlorinated natural abundance and the  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCB 149.



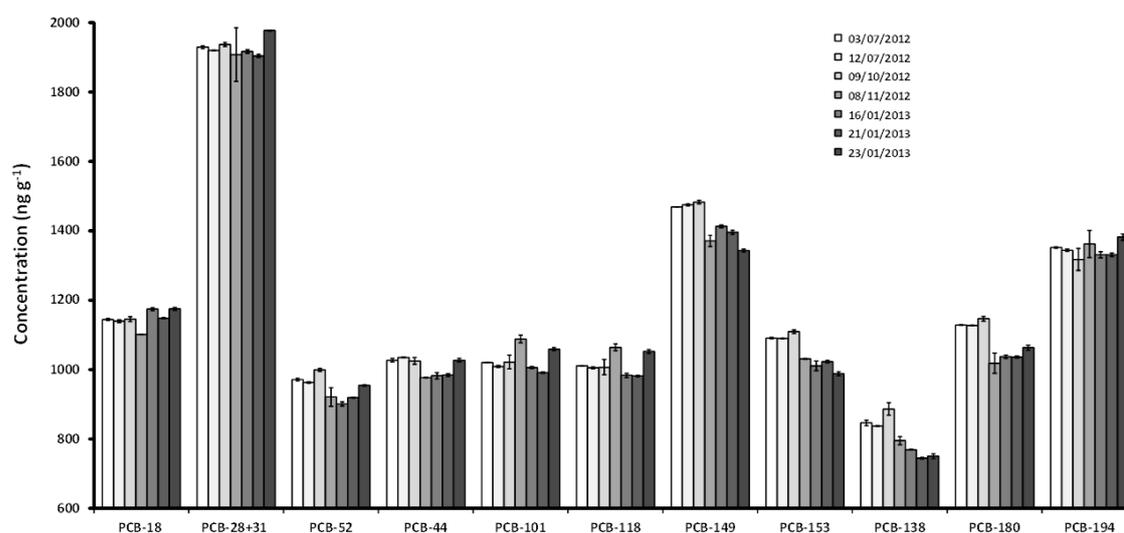
**Figure S7.** Comparison of the GC-MS mass spectra obtained in SCAN mode of the hepta-chlorinated natural abundance and the  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCB 180.



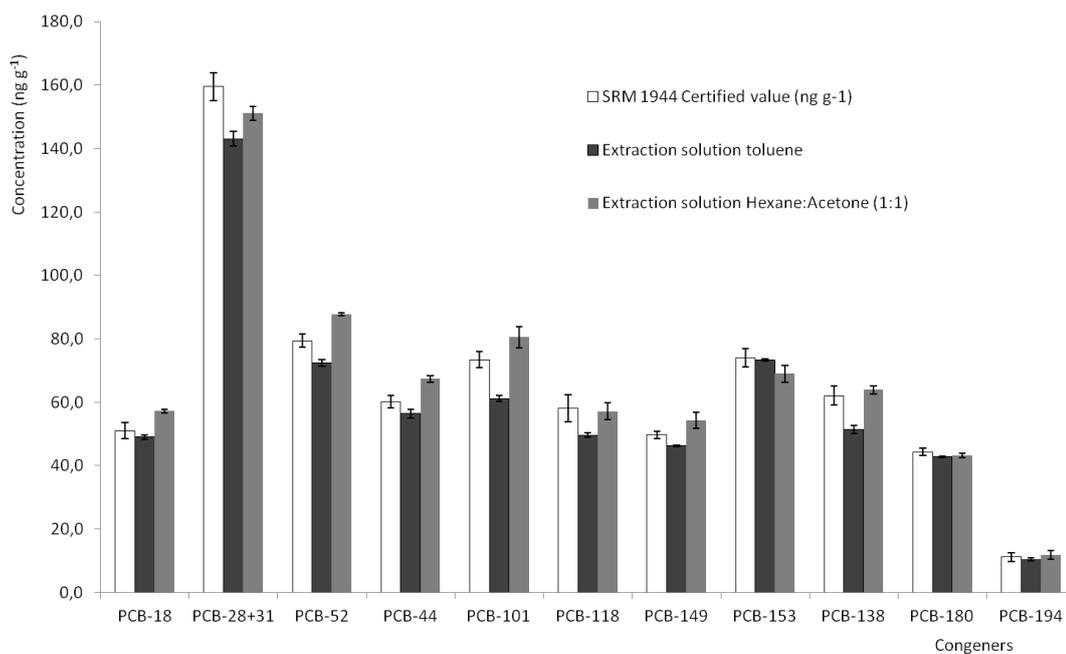
**Figure S8.** Comparison of the GC-MS mass spectra obtained in SCAN mode of the octa-chlorinated natural abundance and the  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCB 194.

**Table S2.** Isotopic enrichment and concentration of the  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCB congeners synthesised in this work. Uncertainty of the isotopic enrichments corresponds to the standard deviation of  $n=6$  independent determinations. Uncertainty of the concentrations corresponds to the standard deviation of  $n=7$  determinations carried out over a period of 6 months.

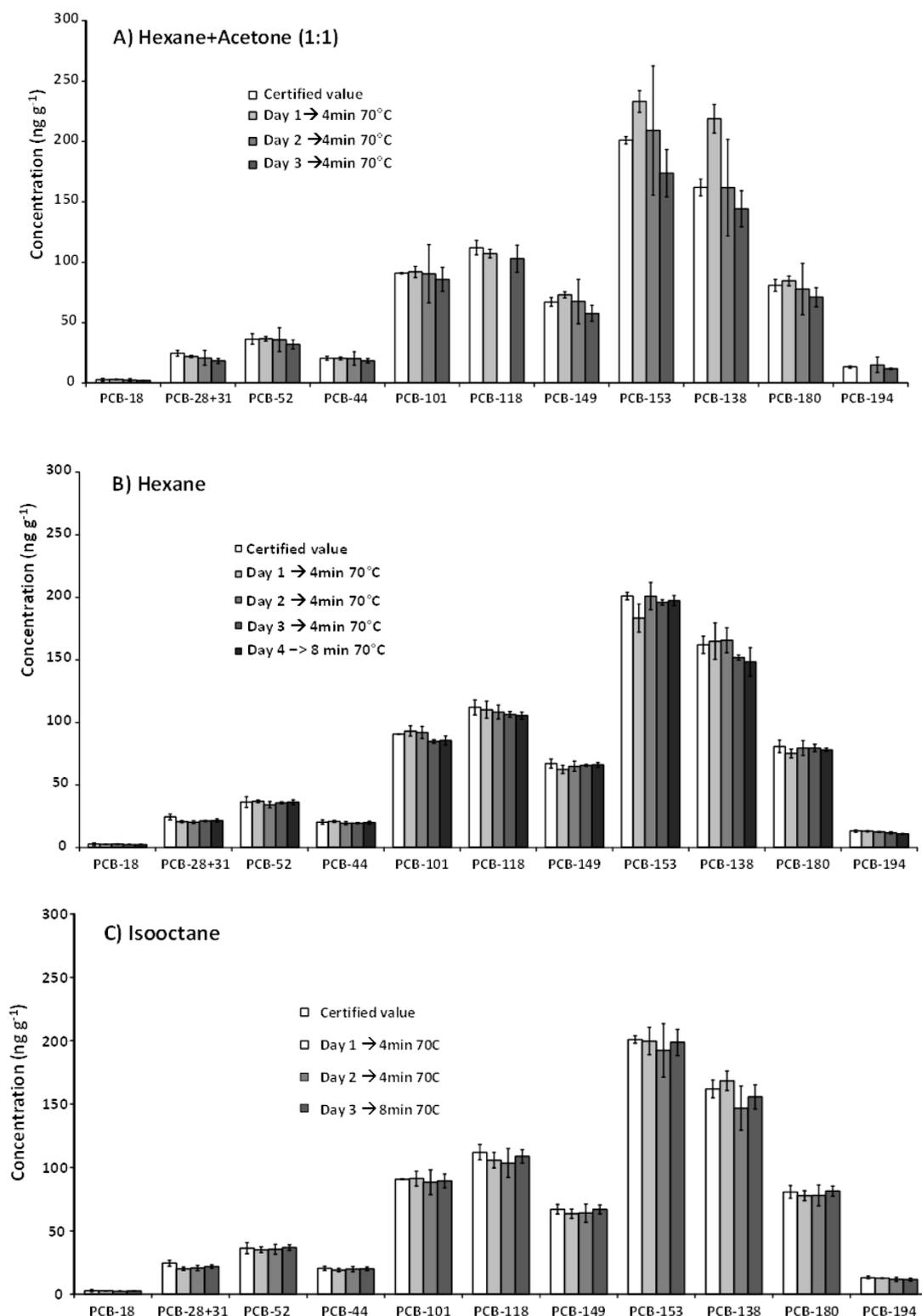
PCB congener	Number of Cl atoms	Isotopic enrichment $^{37}\text{Cl}$ (%)	Concentration ( $\text{ng g}^{-1}$ )
<b>18</b>	3	$94.14 \pm 0.06$	$1147 \pm 25$
<b>28+31</b>	3	$94.05 \pm 0.04$	$1927 \pm 25$
<b>44</b>	4	$94.16 \pm 0.03$	$947 \pm 35$
<b>52</b>	4	$94.06 \pm 0.03$	$1008 \pm 26$
<b>101</b>	5	$94.06 \pm 0.06$	$1028 \pm 34$
<b>118</b>	5	$93.99 \pm 0.03$	$1015 \pm 32$
<b>138</b>	6	$92.51 \pm 0.02$	$1421 \pm 55$
<b>149</b>	6	$92.70 \pm 0.03$	$1049 \pm 47$
<b>153</b>	6	$92.70 \pm 0.03$	$804 \pm 54$
<b>180</b>	7	$91.93 \pm 0.03$	$1079 \pm 53$
<b>194</b>	8	$91.45 \pm 0.03$	$1346 \pm 22$



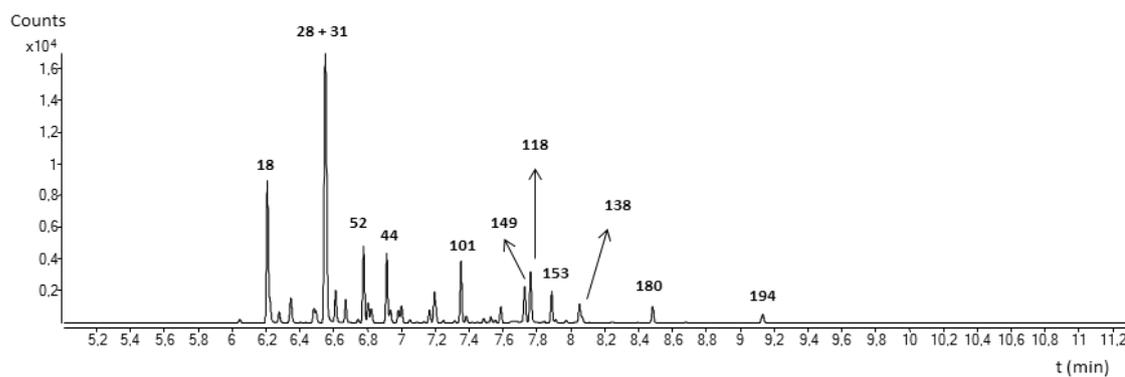
**Figure S9.** Concentration of the  $^{37}\text{Cl}$ -enriched PCBs synthesised in this work over a period of six months. Error bars correspond to the uncertainty of three independent blends expressed as 1s standard deviation.



**Figure S10.** Comparison of the certified and experimental concentrations obtained in the analysis of the certified sediment SRM1944 when using toluene and a 1:1 mixture of hexane and acetone. Error bars of the experimental values correspond to the 1s standard deviation of three independent extractions.



**Figure S11.** Comparison of the certified and experimental concentrations obtained in the analysis of the certified fish tissue SRM 1947 under different extraction conditions when using as extractant A) a 1:1 mixture of hexane and acetone, B) Hexane and C) Isooctane. Error bars of the experimental values correspond to the 1s standard deviation of three independent extractions.



**Figure S12.** GC-MS/MS chromatogram of the reference material SRM1944 New York/New Jersey waterway sediment spiked with 70 ng the <sup>37</sup>Cl- enriched PCBs.

**Table S3.** Blank values (in ng g<sup>-1</sup>) and resulting Limit of Detection obtained for all target PCB congeners except for PCB 180 and PCB-194.

Day	Replicates	PCB-18	PCB-28+31	PCB-52	PCB-44 (ng g <sup>-1</sup> )	PCB-101 (ng g <sup>-1</sup> )	PCB-118 (ng g <sup>-1</sup> )	PCB-149 (ng g <sup>-1</sup> )	PCB-153 (ng g <sup>-1</sup> )	PCB-138 (ng g <sup>-1</sup> )
Day 1	1	0.174±0.019	0.529 ± 0.031	0.801 ± 0.017	0.534 ± 0.040	0.894 ± 0.033	0.500 ± 0.071	0.363 ± 0.104	0.412 ± 0.184	0.298 ± 0.136
	2	0.114 ± 0.015	0.343 ± 0.016	0.487 ± 0.024	0.315 ± 0.033	0.362 ± 0.021	0.151 ± 0.049	0.150 ± 0.010	0.177 ± 0.015	0.215 ± 0.017
	3	0.113 ± 0.029	0.357 ± 0.017	0.503 ± 0.032	0.344 ± 0.033	0.369 ± 0.073	0.128 ± 0.050	0.155 ± 0.010	0.184 ± 0.012	0.227 ± 0.014
Day 2	1	0.117 ± 0.003	0.524 ± 0.065	0.687 ± 0.047	0.499 ± 0.044	0.784 ± 0.066	0.336 ± 0.049	0.293 ± 0.074	0.182 ± 0.038	0.134 ± 0.035
	2	0.110 ± 0.011	0.451 ± 0.018	0.613 ± 0.024	0.422 ± 0.011	0.660 ± 0.010	0.362 ± 0.015	0.301 ± 0.045	0.197 ± 0.017	0.152 ± 0.020
	3	0.114 ± 0.008	0.490 ± 0.011	0.778 ± 0.006	0.518 ± 0.012	0.870 ± 0.030	0.454 ± 0.027	0.382 ± 0.034	0.266 ± 0.021	0.216 ± 0.015
<b>Average (ng g<sup>-1</sup>)</b>		<b>0.124</b>	<b>0.449</b>	<b>0.645</b>	<b>0.438</b>	<b>0.657</b>	<b>0.322</b>	<b>0.274</b>	<b>0.236</b>	<b>0.207</b>
<b>Standard Deviation (S<sub>B</sub>)</b>		<b>0.052</b>	<b>0.185</b>	<b>0.273</b>	<b>0.186</b>	<b>0.332</b>	<b>0.186</b>	<b>0.138</b>	<b>0.123</b>	<b>0.095</b>
<b>Limit of Detection (3S<sub>B</sub>)</b>		<b>0.16</b>	<b>0.56</b>	<b>0.82</b>	<b>0.56</b>	<b>0.99</b>	<b>0.56</b>	<b>0.42</b>	<b>0.39</b>	<b>0.28</b>





**4. 2 Evaluación de la exactitud espectral en espectrómetros de masas utilizando compuestos que contienen átomos de Cl o Br**

**Artículo científico 2: Evaluation of the spectral accuracy of mass spectrometers using compounds containing Cl or Br atoms**

Lourdes Somoano-Blanco, Mélanie Borda, Adriana González Gago, Pablo Rodríguez-González, and J. Ignacio Garcia Alonso.

*Journal of Mass Spectrometry*

*(enviado)*

### 4.2.1 Introducción

La medida exacta y precisa de la composición isotópica de compuestos orgánicos mediante espectrometría de masas es cada vez más importante para la identificación y confirmación estructural en estudios de metabolómica, medioambientales o en el control antidoping. La exactitud con la que se llevan a cabo las medidas de distribuciones isotópicas se evalúa normalmente mediante la relación de abundancias isotópicas  $M+1/M$ . Sin embargo, la medida de esta relación conlleva una elevada incertidumbre relativa del orden del 4%, debida a la variabilidad natural de la composición isotópica del carbono en la naturaleza. Por tanto, se hace necesaria la búsqueda de una evaluación de la exactitud espectral que presente una menor incertidumbre y que proporcione resultados de una mayor calidad metrológica en la medida de las abundancias isotópicas.

Con el objetivo de llevar a cabo esta evaluación, se ha desarrollado en este capítulo una metodología capaz de evaluar la exactitud espectral cometiendo el menor error posible en la medida de las abundancias, con la utilización de compuestos orgánicos halogenados (PCBs y PBDEs). Con este tipo de compuestos orgánicos halogenados se han evaluado las relaciones  $M+2/M$ ;  $M+4/M+2$ , etc, teniendo en cuenta la distribución isotópica molecular característica por la presencia de los isótopos del  $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$  en el caso de los PCBs, y  $^{79}\text{Br}$  y  $^{81}\text{Br}$  para los PBDEs, los cuales están separados por dos unidades de masa. Esta evaluación se ha llevado a cabo en un equipo GC-EI-MS, de cuadrupolo sencillo equipado con una fuente de ionización electrónica. Con la metodología que se propone, utilizando PCBs o PBDEs como compuestos “calibrantes”, se pueden obtener incertidumbres teóricas para las relaciones  $M+2/M$ ,  $M+4/M+2$ , etc, del orden del 0,1%.

Por otra parte, también los PCBs y los PBDEs han sido utilizados para desarrollar una metodología capaz de evaluar la exactitud espectral de equipos de espectrometría de masas en tándem. Para ello se han medido las relaciones experimentales de distintas transiciones SRM cuyos valores teóricos dependen, principalmente de combinaciones matemáticas en lugar de la composición isotópica de los elementos constituyentes.

### 4.2.2 Objetivos

El objetivo fundamental de este capítulo es el desarrollo de dos métodos de evaluación de la exactitud espectral, uno para espectrómetros de masa de cuadrupolo sencillo y otro, para equipos de triple cuadrupolo. Para ello, se han llevado a cabo los siguientes objetivos parciales:

- Cálculo teórico de las distribuciones isotópicas de distintos PCBs y PBDEs, y cálculo de las relaciones  $M+1/M$ ,  $M+2/M$ ;  $M+4/M+2$  específicas para cada uno de los compuestos.
- Comparación de los valores teóricos y experimentales de las relaciones  $M+1/M$ ,  $M+2/M$ ;  $M+4/M+2$  obtenidas para cada uno de los PCBs y PBDEs, utilizando modo de adquisición SIM.
- Evaluación de las incertidumbres teóricas y experimentales de las relaciones  $M+1/M$ ,  $M+2/M$ ;  $M+4/M+2$ , y cálculo teórico de las relaciones entre transiciones SRM en varios PCBs y PBDEs estudiados.
- Medidas de distintas transiciones SRM en PCBs y PBDEs de abundancia isotópica natural mediante un equipo GC-MS/MS de triple cuadrupolo, y comparación entre los valores teóricos y experimentales de las relaciones entre las distintas transiciones en modo SRM.
- Evaluación de las incertidumbres teóricas y experimentales de las relaciones entre transiciones SRM en cada uno de los PCBs y PBDEs estudiados.

#### 4.2.3 Artículo científico 2

### **Evaluation of the spectral accuracy of mass spectrometers using compounds containing Cl or Br atoms**

Lourdes Somoano-Blanco, Melanie Borda, Adriana González Gago, Pablo Rodríguez-González, J. Ignacio Garcia Alonso\*.

Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo. Oviedo, Spain.

\* E-mail: [jiga@uniovi.es](mailto:jiga@uniovi.es)

#### **Abstract**

Current procedures for the evaluation of spectral accuracy of mass spectrometers are limited by the lack of certified isotopic reference materials and the high uncertainty in the isotopic composition of natural abundance molecules. The calculated uncertainties in the ratio  $M+1/M$  for natural abundance molecules containing any number of C, H, N and/or O atoms are close to 4% relative due to the natural variability of the isotopic composition of carbon. So, we have developed two alternative measurement procedures with much lower theoretical uncertainties for a better evaluation of spectral accuracy in both single and triple quadrupole analysers. The first method is based on the measurement of the  $M+2/M$ ,  $M+4/M+2$ , etc. ratios for halogenated organic compounds containing either Cl or Br. The theoretical uncertainties for these ratios because of natural variability are in the order of 0.1% making them suitable for the evaluation of spectral accuracy with the additional advantage that there is no need to take into account other limitations such as cluster purity or poor mass resolution. This procedure was applied to the evaluation of a single quadrupole GC-MS instruments using natural abundance PCB and PBDE standards with satisfactory results. The second method can be applied to tandem instruments and takes advantage of the loss of two halogen atoms when PCB and PBDE standards are fragmented by Collision Induced Dissociation.

Theoretical SRM transition ratios can be calculated as a pure combinatorial probability with theoretical uncertainties lower than 0.1%. By combining PCBs and PBDEs with different number of halogen atoms and measuring different transitions, a mass range from 100 to 700 u and abundance ratios from 0.1 to 10 can be evaluated. The only limitation found was the lower sensitivity for the higher halogenated compounds which provided poor counting statistics and hence larger experimental uncertainties in the measured ratios. Although the proposed methods were evaluated with single and triple quadrupole instruments they could be eventually applied to the evaluation of spectral accuracy of other single stage or tandem mass spectrometers.

**Keywords:** Spectral accuracy, Triple quadrupole, PCBs, PBDEs, Theoretical uncertainties.

### Introduction

Spectral accuracy in molecular Mass Spectrometry can be defined as the capability of a mass spectrometer to provide mass spectra in agreement with the theoretical isotope distribution of a molecule calculated from the isotopic composition of its constituting atoms [1]. There are different fields in which accurate molecular isotope distribution measurements are required such as the determination of elemental compositions [1, 2], metabolic studies with enriched isotopes [3], the determination of the enrichment of labelled molecules [4] and in analytical measurements using Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) in combination with Isotope Pattern Deconvolution [5] to cite only a few examples.

In the last few years several works have reported the evaluation of the spectral accuracy of different mass spectrometers including, Orbitrap [6-9] and TOF [9-10] analysers. The reason for this interest is the fact that, the combination of exact mass determinations and accurate isotope distribution measurements, helps in narrowing down the number of possible formulas which can be assigned to an unknown compound [2]. In most cases, spectral accuracy was evaluated by comparison of the experimental  $M+1/M$  ratios in certain target molecules with theoretically derived ratios calculated from the isotope composition of their constituting atoms. The problem with this procedure is that the theoretically derived ratios may have uncertainties of the order of 4% relative because of the natural variability of the isotope composition of carbon. As an alternative, certified isotopic reference materials could be employed to calibrate the mass spectrometers used as it is customary in elemental mass spectrometry [11, 12]. Unfortunately, no reference materials certified for molecular isotope distributions exist.

Several problems have been reported when evaluating the spectral accuracy of mass spectrometers. For example the recognition that signal processing in Fourier transform may cause peak distortion for neighbouring peaks [13] and the fact that non-linear response of Orbitrap mass spectrometer may affect IDMS calculations [14]. The aforementioned problems and the recent development of a GC/Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer [15], prompted us to develop procedures which could be applied to better evaluate mass spectrometers for spectral accuracy without the drawbacks of the current procedures. For example, when using Electron Ionization (EI) sources the purity of the

mass cluster will affect the results obtained [4] because of the coexistence of  $(M)^+$  and  $(M\pm H)^+$  in the ion source for certain molecules. Additionally, low resolution quadrupole analyzer may suffer for tailing into adjacent peaks causing a distortion of the measured isotope distributions [4]. These two factors, together with the high uncertainty of the theoretical isotope distributions, make experimental and theoretical  $M+1/M$  ratios not a good choice for the evaluation of mass spectrometers in terms of spectral accuracy. An ideal method should be free of problems related to the purity of the cluster in the ion source or lack of spectral resolution in quadrupole analyzers and should be applicable to any mass spectrometer. Additionally, theoretically derived ratios should have very low uncertainties to better pinpoint spectral accuracy problems.

In this paper we propose two alternative procedures for the evaluation of spectral accuracy both for single and tandem mass spectrometers. These procedures are implemented here only in single and triple quadrupole analyzers coupled to Gas Chromatography using an EI source. However, the basic idea is general and they could be easily implemented for other single stage or tandem mass spectrometers including TOF and Orbitrap analysers and other ion sources. In our procedures Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are proposed as test compounds and the ratios  $M+2/M$ ,  $M+4/M+2$ , etc. selected for the evaluation of spectral accuracy. These ratios have theoretical uncertainties of the order of 0.1% and are not affected by cluster purity in the EI source or the poor mass resolution of quadrupole analyzers.

### **Experimental**

#### Reagents and materials

A  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  mixture of six PCBs (congeners 18, 52, 101, 138, 180, 194) in heptane was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Similarly, a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  mixture of five PBDEs (congeners 28, 47, 100, 154, 183) was purchased from Accustandard Inc. (New Haven, USA). Additionally, individual  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  certified standards of 7 PBDEs congeners (28, 47, 99, 100, 153, 154 and 183), obtained from Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, USA) were employed. Working standard solutions were prepared by dilution of the stock solutions in isoctane (Sigma-

Aldrich) or preconcentrated by evaporation of the solvent (PCBs) and were stored in the dark at 4°C until use.

### Instrumentation

The GC-MS single quadrupole instrument consisted of a GC model 6890N (Agilent Technologies, Waldbrom, Germany) fitted with a split/splitless injector and equipped with a MSD model 5975B (Agilent Technologies, Tokyo, Japan). The chromatographic separation was carried out using a low polarity capillary column HP-5MS (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) purchased to J&W Scientific (Folsom, CA, USA).

The GC-MS/MS instrument consisted of a GC model Agilent 7890A (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) fitted with a split/splitless injector coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole Mass Spectrometer equipped with an EI source. The chromatographic separation was carried out using a DB-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) purchased to Agilent technologies (Santa Clara, USA). Operating conditions have been included in the supplementary material Table S1.

### Procedures

#### *Measurement of isotope distributions in the single quadrupole instrument.*

All isotope distributions were measured as relative peak area abundances in selective ion monitoring (SIM) mode by selecting 10-12 consecutive masses corresponding to the molecular ion of each compound starting from the monoisotopic mass. Isotopologue ratios were measured as peak area ratios for the corresponding masses. Five injections were performed and the final results correspond to the average and standard deviation of the five individual isotope distributions or isotope ratios.

#### *Measurement of isotope distributions in the triple quadrupole instrument.*

All isotope distributions were measured as relative peak area abundances obtained by selected reaction monitoring (SRM). For this purpose, one mass corresponding to the molecular ion cluster was selected in the first quadrupole for each compound, fragmented in the collision cell and the different product ions corresponding to the loss of two halogen atoms were measured in the second mass analyser using the same dwell

time. Five injections were performed and the final results correspond to the average and standard deviation of the five individual isotope distributions or isotopologue ratios. When a different precursor ion was evaluated the whole procedure was repeated.

### *Calculation of theoretical isotope distributions and their uncertainties.*

Theoretical isotope distributions and their uncertainties for the molecular ions were calculated using the Isotope Distribution Calculator (IDC.xls) excel spreadsheet which can be downloaded from the supplementary material of a previous work [4]. Details of the calculation procedure employed were given elsewhere [17, 18]. Theoretical isotope distributions for the product ions in tandem instruments were calculated using the software IsoPatrn developed by Ramaley and Cubero-Herrera [16]. The uncertainties of the isotope distributions provided by IsoPatrn were calculated using the Kragten spreadsheet procedure [19] assuming that the uncertainty in the isotope composition of carbon was the main source of uncertainty. In all cases, the atomic isotope abundances and their uncertainties employed to calculate the molecular isotope distributions corresponded to the IUPAC values [20].

## **Results and discussion**

### Theoretical uncertainties for the M+1/M and M+2/M ratios in organic compounds.

The representative isotopic composition (mole fraction) of carbon is given in reference [20] as “the isotopic composition of chemicals and/or natural materials that are likely to be encountered in the laboratory” and corresponds to 0.9893(8) for carbon-12 and 0.0107(8) for carbon-13. The expanded uncertainties listed in parentheses “include the range of probable isotope-abundance variations among different materials as well as measurement uncertainties” [20]. When we combine several carbon atoms to form an organic molecule the isotope composition of this molecule can be calculated based on a binomial or polynomial distribution [17]. Additionally, and because of the uncertainties in the isotope composition of carbon, this molecular isotope distribution will also have uncertainties which can be calculated either by spreadsheet procedures [17] or Montecarlo simulations [21]. For example, for an hypothetical C<sub>60</sub> molecule the relative isotope composition for M, M+1 and M+2 at nominal masses 720, 721 and 722 can be calculated as 0.5244(147), 0.3403(53) and 0.1086(64) respectively. The numbers in

parentheses correspond to the calculated standard uncertainties assuming that the uncertainties tabulated for carbon correspond to a rectangular distribution [17]. As can be observed, the isotope abundance for the monoisotopic ion M at mass 720 has a large relative uncertainty of 2.80% and those for the M+1 and M+2 ions are 1.56 and 5.89%, respectively.

When we calculate the theoretical abundance ratios M+1/M or M+2/M we obtain 0.6489 and 0.2071 respectively. Those theoretical ratios will have an associated uncertainty which can be calculated using equation (1):

$$\frac{u(R)}{R} = \sqrt{\left(\frac{u(A^i)}{A^i}\right)^2 + \left(\frac{u(A^k)}{A^k}\right)^2 - 2 \cdot r_{ik} \cdot \left(\frac{u(A^i)}{A^i}\right) \left(\frac{u(A^k)}{A^k}\right)} \quad (1)$$

Where  $u(R)$  is the standard uncertainty of the ratio  $R$  and  $u(A^i)$  and  $u(A^k)$  are the standard uncertainties of the abundances  $A^i$  and  $A^k$  respectively. The isotope abundances are variables of constant sum so they are correlated [21]. The correlation coefficient  $r_{ik}$  between two isotope abundances,  $A^i$  and  $A^k$ , could be calculated according to the equation given by Meija and Mester [21] as:

$$r_{ik} = \text{sgn}\left(\frac{W - w^i}{W - w^k}\right) \quad (2)$$

Where  $W$  is the average molecular weight of the compound and  $w^i$  and  $w^k$  the exact masses of the considered isotopologues. The function “sgn” provides the sign of the correlation coefficient either +1 or -1.

For the  $C_{60}$  molecule the correlation coefficients  $r_{ik}$  are -1 both for the M+1/M and the M+2/M ratios [21]. So, using equations (1) and (2) we can calculate the standard uncertainties for the M+1/M and M+2/M ratios obtaining 0.0283 and 0.0181 respectively. These values correspond to a relative uncertainty of 4.36% for the M+1/M ratio and of 8.73% for the M+2/M ratio respectively. In our opinion, these theoretical uncertainties due to the natural variation in the isotope composition of carbon are too high for these ratios to be employed in the evaluation of the spectral accuracy of mass

spectrometers. Unfortunately, these high relative uncertainties are constant and independent from the number of carbon atoms in the molecule. Moreover, the presence of other atoms in the molecule such as hydrogen, oxygen or nitrogen does not provide a significant decrease of the theoretical uncertainties. For example the M+1/M ratio for a peptide of formula  $C_{50}H_{71}O_{12}N_{13}$  can be calculated to be 0.6010 with a relative uncertainty of 3.97%.

According to these results, there is a need to develop either materials certified for their molecular isotope distributions or procedures with much smaller theoretical uncertainties to better evaluate the spectral accuracy of modern mass spectrometers. The best alternative is to use reference materials certified in their carbon isotope composition but those materials do not exist nowadays for the purpose of calibrating organic mass spectrometers. So, we have explored the other alternative and searched for measurement procedures with much smaller theoretical uncertainties. We have considered certain organic compounds containing several chlorine or bromine atoms that provide much smaller theoretical uncertainties. For example, we have calculated the theoretical uncertainties for the ratios M+1/M and M+2/M for the families of Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Polybrominated Diphenyl ethers (PBDEs) as a function of the number of halogen atoms in the molecule. The results are shown in Figure 1A for PCBs and in Figure 1B for PBDEs. As can be observed, the M+1/M ratios have theoretical uncertainties of the order of 3% while for the M+2/M ratios these uncertainties decrease drastically as the number of halogen atoms in the molecule increase to values approaching 0.1 to 0.2% for both families of compounds. For PBDEs we have represented also the M+4/M+2 ratios with theoretical uncertainties below 0.1%. These compounds and these alternative ratios would be a viable alternative for the evaluation of spectral accuracy of single quadrupole analysers.

### Evaluation of spectral accuracy in single quadrupole analysers.

We evaluated the ratio M+1/M for several PCBs and PBDEs. For the PCBs the theoretical ratio M+1/M is approximately constant (between 0.1330 and 0.1324 depending on the number of halogen atoms in the molecule) while a range of 0.1309 to 0.1305 was calculated for PBDEs containing between 3 and 6 bromine atoms. Figure 2 shows the results obtained. As it can be observed, a large systematic error was obtained

which, for PCBs, depended on the number of chlorine atoms in the molecule. This systematic error can be ascribed to the tailing of the mass peaks at the low mass range in our quadrupole analyser as described previously [18]. The M+2 peak in halogenated compounds is larger than the M+1 peak and its tailing will affect the abundance of the M+1 peak creating these large positive errors which, for PBDEs, approached 25% relative.

Figure 3 shows the experimental results obtained both for PCBs and PBDEs for the ratios M+2/M, M+4/M+2, M+6/M+4 and M+8/M+6 in comparison with the theoretical ratios. The error bars correspond to the standard deviation of 5 independent injections of the PCB or PBDE mixture. Experimental relative standard deviations ranged between 0.2 and 2% depending on the compound and ratio measured. The slope of the weighed least squares line for PCBs was 0.9978 while a value of 0.9946 was obtained for the PBDEs. According to these results, the single quadrupole analyser used was able to measure accurately isotopologue ratios between 0 and 4 when using the halogenated compounds as test substances.

#### Evaluation of spectral accuracy in triple quadrupole analysers.

The main fragmentation reaction both for PCBs and PBDEs by Collision Induced Dissociation (CID) corresponds to the loss of two halogen atoms. We have included two mass spectra in the supplementary information Figure S1 to show this point.

If we measure several product ions from the same precursor ion using the SRM mode in a triple quadrupole instrument, the relative abundance between the different transitions will depend only on pure mathematical permutations and will be independent from the natural isotope abundances. This is illustrated graphically in Figure 4 for two selected precursor ions of a hexabrominated diphenyl ether. The precursor ion at mass 639.5 u corresponds mainly to the isotopologue  $^{12}\text{C}_{12}^{1}\text{H}_4^{16}\text{O}_1^{79}\text{Br}_5^{81}\text{Br}_1$  being the only possible losses  $^{79}\text{Br}_2$  and  $^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}$  with 10 and 5 possible permutations, respectively. On the other hand, the precursor ion at mass 645.5 u corresponds mainly to the isotopologue  $^{12}\text{C}_{12}^{1}\text{H}_4^{16}\text{O}_1^{79}\text{Br}_2^{81}\text{Br}_4$  being the possible losses  $^{79}\text{Br}_2$ ,  $^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}$  and  $^{81}\text{Br}_2$  with 1, 8 and 6 possible permutations respectively.

One can directly calculate the ratios of the possible permutations to obtain the theoretical ratios that should be obtained when measuring the different SRM transitions. However, the presence of  $^{18}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}_2$  or  $^2\text{H}_2$  in the precursor ion will disturb slightly these predictions. Therefore, we have used the software IsoPtrn [16] to calculate the actual probabilities for the fragmentation of the precursor ions. Taking again the example of the hexabrominated diphenyl ether, the probability for the fragmentation of the isotopologue at mass 639.5 is 0.6672 for the loss of  $^{79}\text{Br}_2$  and 0.3328 for the loss of  $^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}$ . In the same way, the actual probability calculated for the fragmentation of mass 645.5 is 0.0685 for the loss of  $^{79}\text{Br}_2$ , 0.5342 for the loss of  $^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}$  and 0.3973 for the loss of  $^{81}\text{Br}_2$ . If we consider now the ratio of possible permutations, taking the 1, 8 and 6 possible permutations for mass 645.5 the probabilities are 1/15, 8/15 and 6/15 which resulted in 0.0667, 0.5333 and 0.4000 respectively. These values are very close to those calculated by the software IsoPtrn [16].

We have calculated the theoretical abundances for the fragmentation of different PCBs and PBDEs in a triple quadrupole analyser and those data have been included in the supplementary material Tables S2 and S3. In order to evaluate spectral accuracy we need to measure the experimental ratios of the SRM transitions and compare them with the theoretical ratios. However, we also need to know the uncertainty of those theoretical ratios which will depend mainly on pure mathematical permutations so the effect of the natural variations of the isotopic composition of the elements is expected to be negligible. For this purpose, we have applied the Kragten procedure [19] in the following fashion: we calculated the fragment ion distribution with IsoPtrn for PCBs and PBDEs using the nominal IUPAC abundances for all the elements and then again using synthetic elements Xc (carbon), Xo (oxygen), Xcl (chlorine) and Xbr (bromine) with the abundances altered by their standard uncertainties due to natural variation. It was observed that only the natural variation of carbon affected slightly the distributions calculated. The theoretical ratios and their uncertainties for PCBs and PBDEs are included in the supplementary material Tables S4 and S5. We can summarize here that the ratios range from 0.066 to 7.55 for PCBs and from 0.100 to 9.70 for PBDEs. Also, and in most cases, the theoretical uncertainties of those ratios were lower than 0.1% relative making these compounds and these fragmentation reactions suitable for the evaluation of spectral accuracy in tandem instruments.

Experiments were performed at two different concentration levels (10 and 20  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) for both the PCB and the PBDE mixtures to study concentration-derived effects. The concentrations were selected at the  $\mu\text{g g}^{-1}$  level to improve counting statistics. The results found for 5 independent injections and all the SRM transitions studied are given in Tables S6 to S9 in the supplementary material. The average and the standard deviations for all measurements are included in those tables. The first conclusion was that we did not observe concentration effects on the measured SRM transition ratios. Only the standard deviations improved at higher concentrations due to counting statistics particularly for the highly chlorinated and brominated compounds. In order to see any effect related to the mass of the precursor and fragment ion considered we divided the experimental ratios by the theoretical ratios and represented them as a function of the mass of the precursor ion considered. Figure 5 shows the results for the higher concentration studied (20  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) where we can observe that there is no influence of the mass of the precursor ion on the experimental SRM ratios. Only the data obtained for the highly brominated compounds (hexa and hepta brominated) showed high uncertainties due to the low peak areas observed. For PCBs the uncertainties were always of the order of 1-2% relative with spectral accuracy errors lower than 2% on average. For 10  $\mu\text{g g}^{-1}$  the results were similar. These results are given in Figure S2 of the supplementary material. Finally, and in order to study the effect of the measured SRM ratios on spectral accuracy we represented the results obtained versus the theoretical ratios for the range of 0 to 4 in Figure 6. The data for PCBs fit a straight line of slope 0.9949 which indicates a good agreement between the theoretical and experimental ratios. For PBDEs we also observe a good fit of the data but with somehow larger uncertainties.

## **Conclusions**

The comparison of the experimental M+1/M ratios with theoretically derived ratios calculated from the isotope composition of their constituting atoms is the usual procedure to evaluate spectral accuracy in Mass Spectrometry. However, the high uncertainty of theoretically derived ratios due to the natural variability of the isotope composition of carbon may lead to significant errors. Additional errors can arise from the lack of spectral purity when using EI sources or from the tailing into adjacent peaks that cause distortion of the measured isotope distributions when using low resolution

quadrupole analysers [4]. For these reasons we consider that comparing experimental and theoretical  $M+1/M$  ratios is not a good choice for the evaluation of mass spectrometers in terms of spectral accuracy. Therefore we have developed here two different procedures for the evaluation of spectral accuracy in single and tandem mass spectrometers. First, we propose the measurement of the  $M+2/M$ ,  $M+4/M+2$ ,  $M+6/M+4$  and  $M+8/M+6$ , etc. ratios in organic molecules containing several chlorine or bromine atoms for their comparison with the theoretical ratios as an alternative procedure to evaluate the mass accuracy of single quadrupole instruments. Using a mixture of several PCBs and PBDEs we have demonstrated that although  $M+1/M$  ratios have theoretical uncertainties of the order of 3% the uncertainty in  $M+2/M$  ratios decrease drastically with the number of halogen atoms in the molecule approaching 0.1 to 0.2% for both families of compounds. Experimental values obtained both for PBDEs and PCBs agreed well with the theoretical values and the obtained relative standard deviations ranged between 0.2 and 2% depending on the compound and ratio measured.

Secondly, for the evaluation of the spectral accuracy in tandem MS instruments we propose the measurement of SRM transitions ratios when chlorinated or brominated compounds fragment in a collision cell by CID losing two chlorine or bromine atoms. We have demonstrated that theoretical SRM transition ratios can be easily calculated as a pure combinatorial probability with theoretical uncertainties lower than 0.1%. Experiments performed at three different concentration levels of several PCBs and PBDEs showed good agreement between the theoretical and experimental ratios regardless the mass of the precursor ion. So, we are confident on the spectral accuracy characteristics of our single and triple quadrupole analysers.

### Acknowledgements

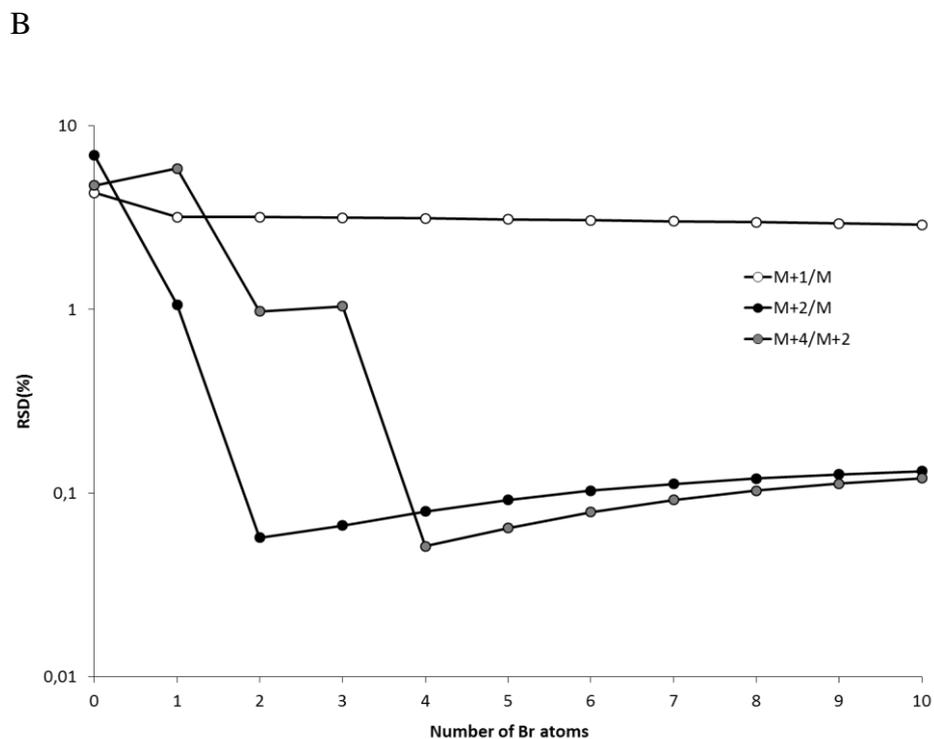
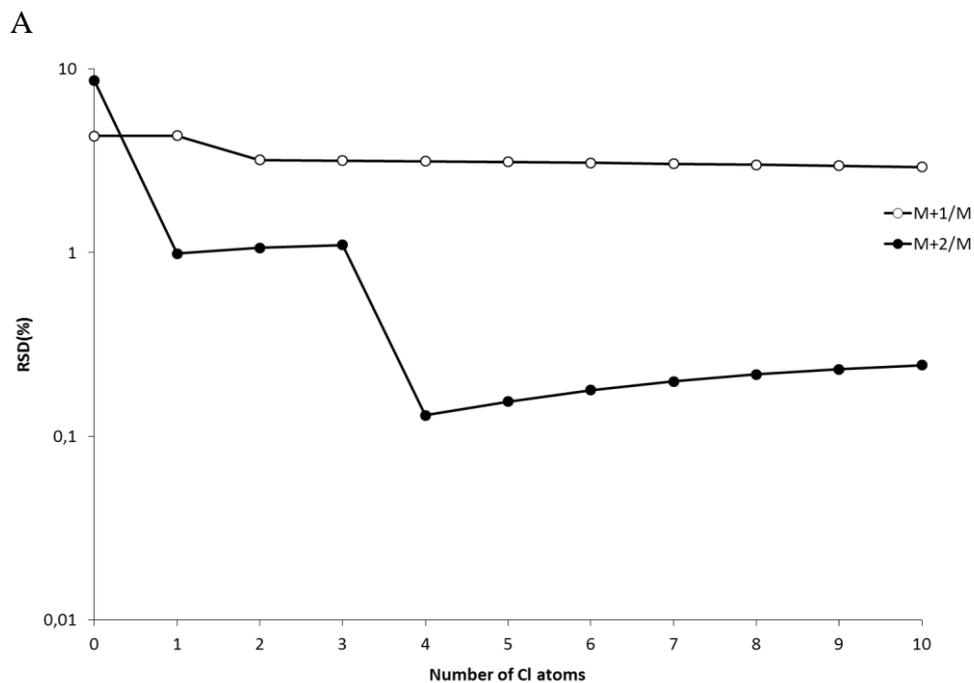
Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through Project CTQ2012-36711 (cofounded by FEDER) is acknowledged. The UE is acknowledged for the provision of FEDER funds for the purchase of the GC-MS/MS instrument.

### References

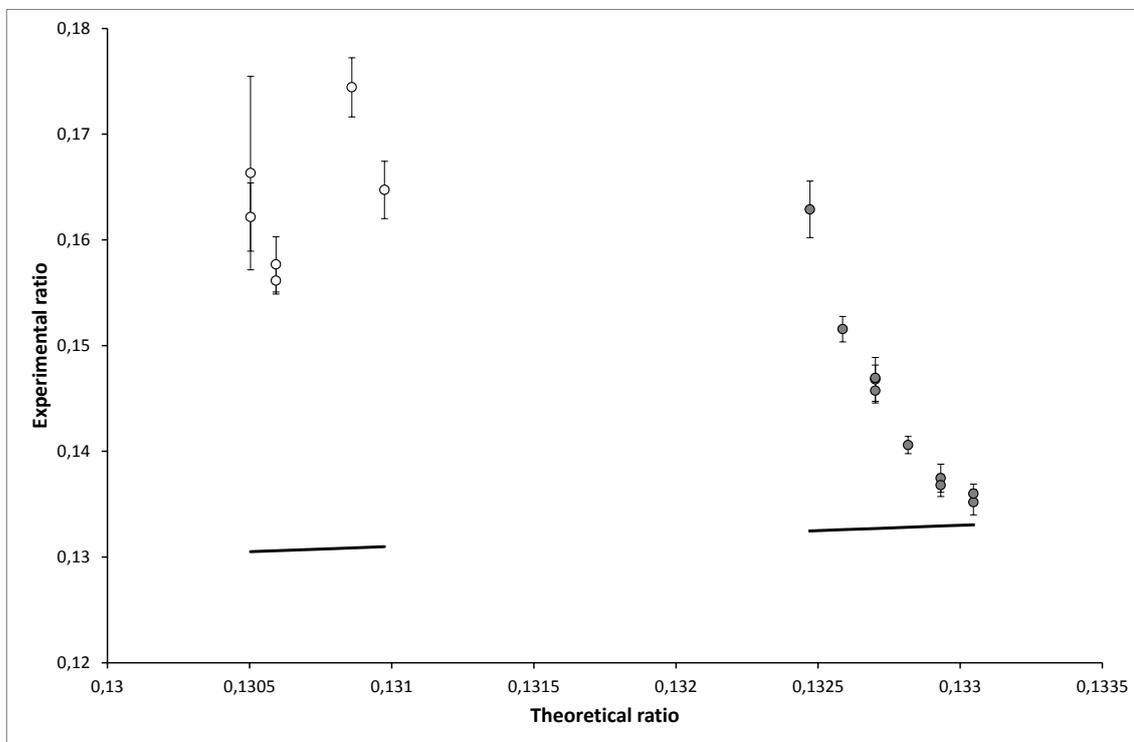
- [1] Y. Wang, M. Gu. The Concept of Spectral Accuracy for MS. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7055.
- [2] T. Kind, O. Fiehn. Seven golden rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinform.* **2007**, *8*, 105.
- [3] J. Choi, M. T. Grossbach, M. R. Antoniewicz. Measuring Complete Isotopomer Distribution of Aspartate Using Gas Chromatography / Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 4628.
- [4] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, J. I. García Alonso. Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 681.
- [5] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, R. Ohlendorf, A. Henrion, V. Delatour, J. I. García Alonso. Determination of Cystatin C in human serum by isotope dilution mass spectrometry using mass overlapping peptides. *J. Proteomics.* **2015**, *112*, 141.
- [6] R. J. M. Weber, A. D. Southam, U. Sommer, M. R. Viant. Characterization of Isotopic Abundance Measurements in High Resolution FT-ICR and Orbitrap Mass Spectra for Improved Confidence of Metabolite Identification. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3737.
- [7] J. C. L. Erve, M. Gu, Y. Wang, W. DeMaio, R. E. Talanta. Spectral Accuracy of Molecular Ions in an LTQ/Orbitrap Mass Spectrometer and Implications for Elemental Composition Determination. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 2058.
- [8] Y. Xu, J. F. Heilier, G. Madalinski, E. Genin, E. Ezan, J. C. Tabet, C. Junot. Evaluation of Accurate Mass and Relative Isotopic Abundance Measurements in the LTQ-Orbitrap Mass Spectrometer for Further Metabolomics Database Building. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 5490.
- [9] A. M. Knolhoff, J. H. Callahan, T. R. Croley. Mass Accuracy and Isotopic Abundance Measurements for HR-MS Instrumentation: Capabilities for Non-Targeted Analyses. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, *25*, 1285.
- [10] A. H. Grange1, M. C. Zumwalt, G. W. Sovocool. Determination of ion and neutral loss compositions and deconvolution of product ion mass spectra using an orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer and an ion correlation program. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 89.
- [11] F. Vanhaecke, P. Degryse Eds. *Isotopic analysis. Fundamentals and Applications using ICP-MS*. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2012.

- [12] M. A. Jochmann and T. C. Schmidt, *Compound-specific Stable Isotope Analysis*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2012
- [13] A. L. Rockwood, J. C. L. Erve. Mass Spectral Peak Distortion Due to Fourier Transform Signal Processing. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2014**, 25,2163.
- [14] L. Ouerdane, J. Meija, S. Bakirdere, L. Yang, Z. Mester. Nonlinear Signal Response in Electrospray Mass Spectrometry: Implications for Quantitation of Arsenobetaine Using Stable Isotope Labeling by Liquid Chromatography and Electrospray Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 3958.
- [15] A. C. Peterson, J. P. Hauschild, S. T. Quarmby, D. Krumwiede, O. Lange, R. A. S. Lemke, F. Grosse-Coosmann, S. Horning, T. J. Donohue, M. S. Westphall, J. J. Coon, J. Griep-Raming. Development of a GC/Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer, Part I: Design and Characterization. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 10036.
- [16] L. Ramaley, L. Cubero Herrera. Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, 22, 2707.
- [17] J. I. García Alonso, P. Rodríguez-González, A. González-Gago, A. González Antuña. The determination of the uncertainties in the theoretical isotope peak distribution of molecules. *Anal. Chim. Acta.* **2010**, 664, 68.
- [18] J. I. Garcia Alonso, P. Rodriguez Gonzalez. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. Royal Society of Chemistry, Cambridge (UK), **2013**.
- [19] J. Kragten. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst*, **1994**, 119, 2161-2165.
- [20] M. Berglund, M. E. Wieser. Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2011**, 83, 397.
- [21] J. Meija, Z. Mester. Comments on the uncertainties in isotope patterns of molecules. *Anal. Chim. Acta.* **2011**, 694, 174-176.

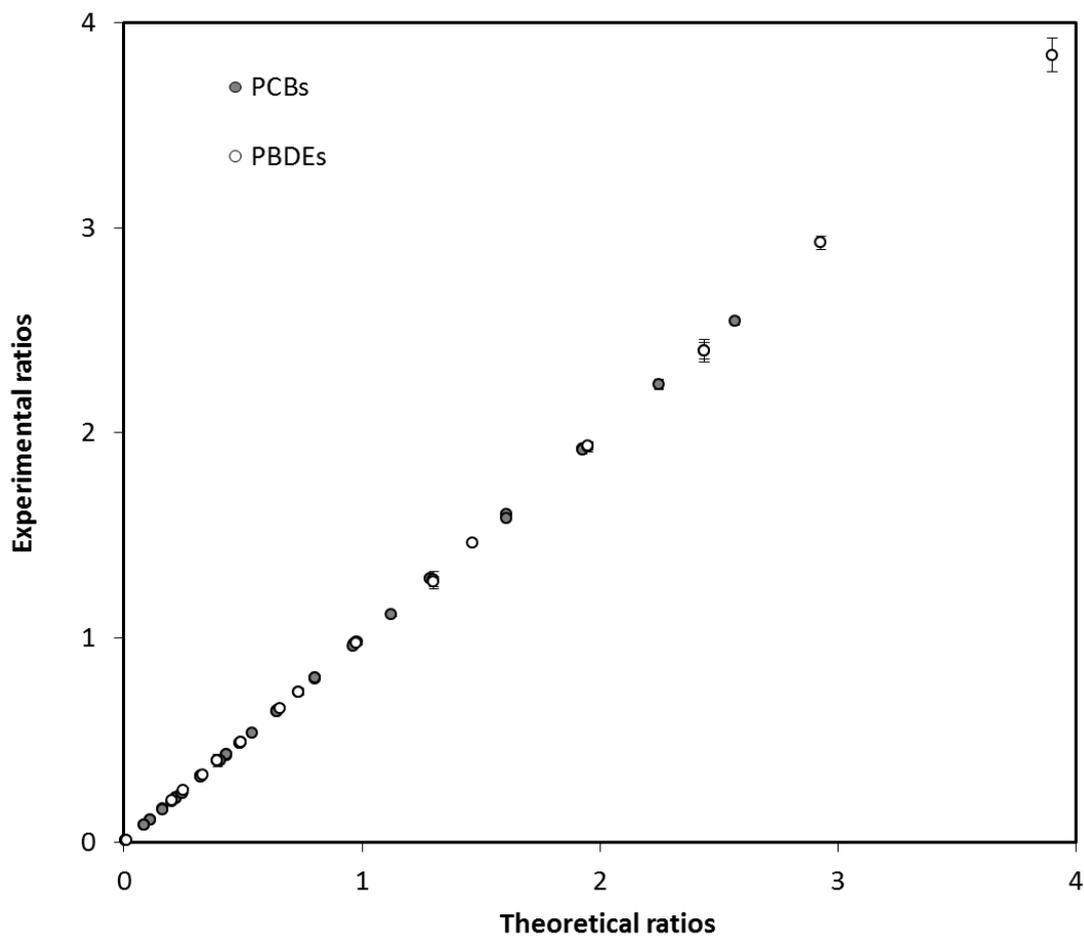
**Figure 1.** Theoretical relative uncertainties for the M+1/M and M+2/M ratios as a function of the number of halogen atoms in the molecule for (A) PCBs and (B) PBDEs. Note that for PBDEs the ratio M+4/M+2 has also been included.



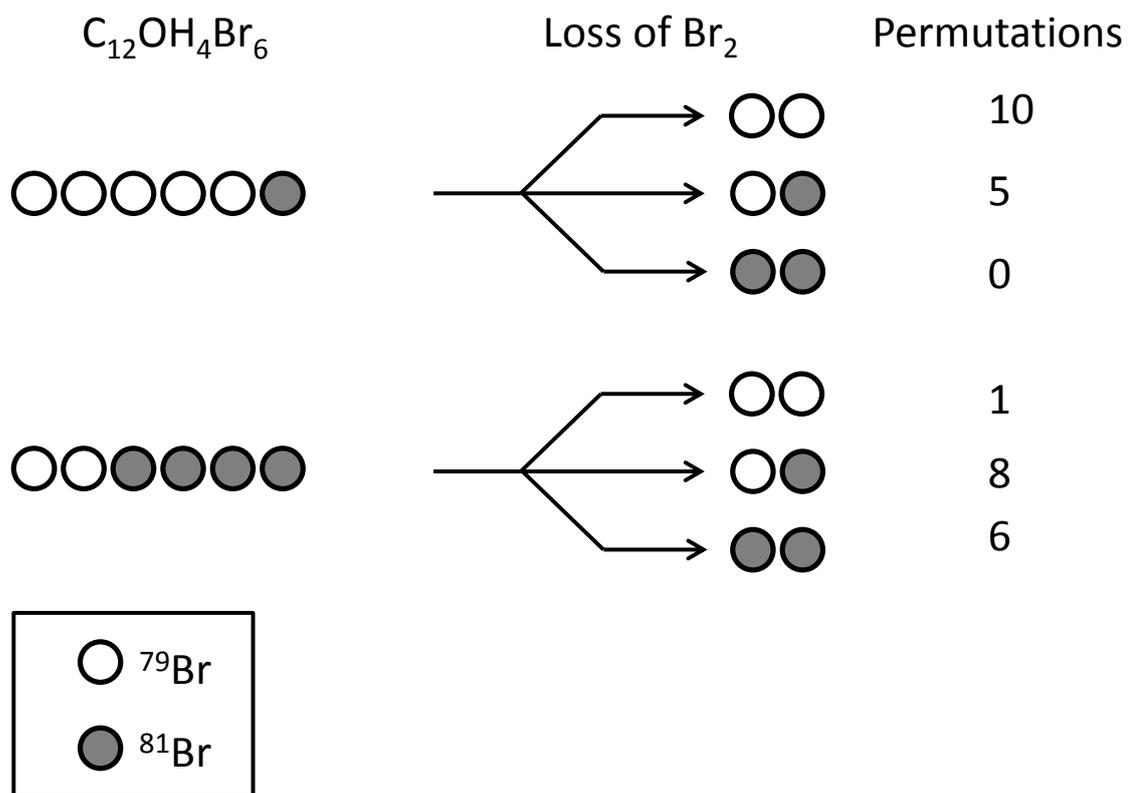
**Figure 2.** Comparison of the experimental M+1/M ratios measured in a single quadrupole GC-MS instrument with the theoretical ratios for PCBs (grey circles) and PBDEs (white circles). The expected agreement is shown with the two horizontal lines.



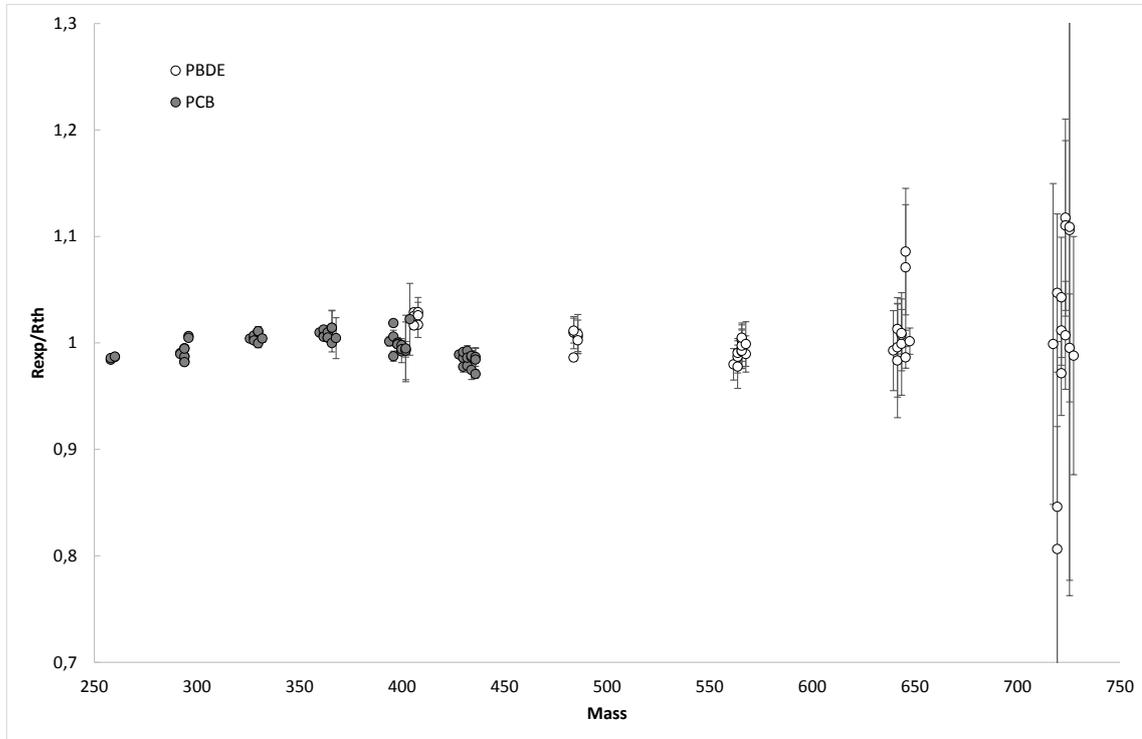
**Figure 3.** Comparison of the experimental  $M+2/M$ ,  $M+4/M+2$ ,  $M+6/M+4$  and  $M+8/M+6$  ratios with the theoretical ratios obtained for different PCBs and PBDEs by single cuadrupole GC-MS. The error bars correspond to the standard deviation of 5 independent injections of the PCB or PBDE mixture.



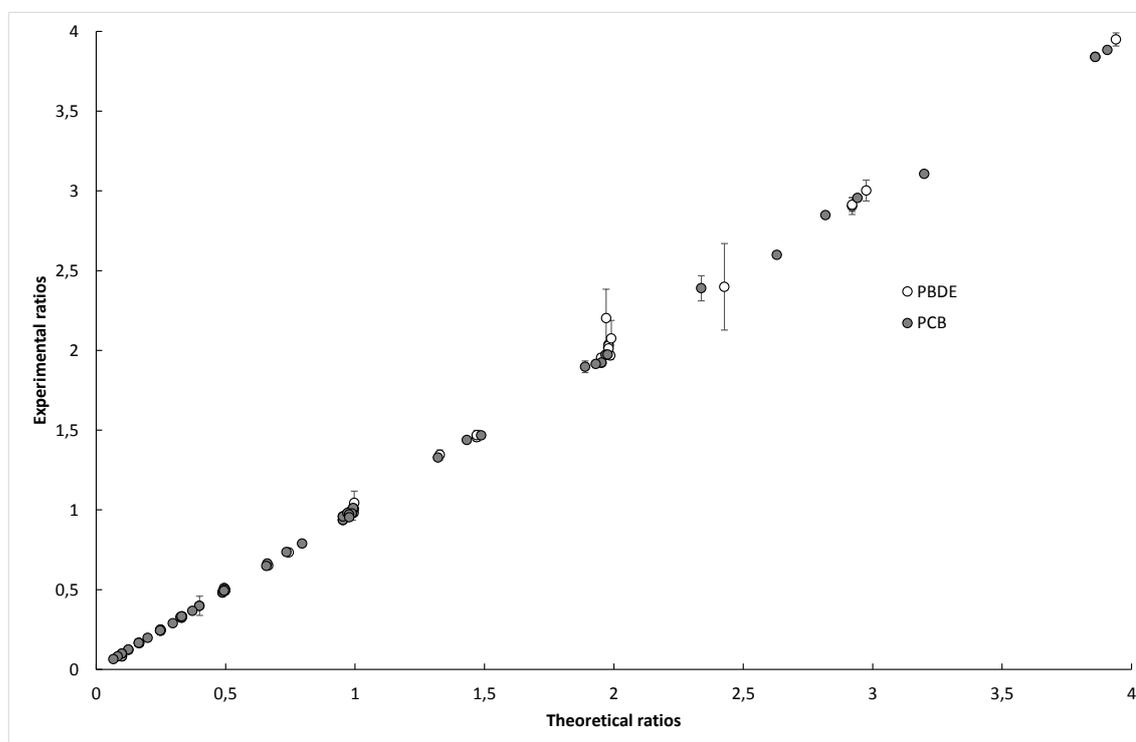
**Figure 4.** Possible permutations for the loss of two bromine atoms in the hexabrominated PBDE at masses 639.5 (top) and 645.5 (bottom)



**Figure 5.** Spectral accuracy of the triple quadrupole instrument, expressed as the ratio between the experimental and theoretical ratios, for PCBs and PBDEs injected at 20 ppm as a function of the mass of the precursor ion selected in the first quadrupole.



**Figure 6.** Comparison of the experimental ratios measured in the triple quadrupole instrument with the theoretical ratios for PCBs and PBDEs.



## SUPPORTING INFORMATION

**Table S1: Experimental conditions for the GC-QqQ for the measurement of PCB and PBDE**

GC and interface parameters			
Program for the PCB measurement		Program for the PBDE measurement	
Column	DB-5MS (30m, 0.25mm, 0.25 µm)	Column	DB-5MS (30m, 0.25mm, 0.25 µm)
Injection mode	Splitless	Injection mode	Splitless
Sampling time	1 min	Sampling time	1 min
Injection volume	2 µL	Injection volume	2 µL
Carrier gas/Flow	He/ 2 mL/min	Carrier gas/Flow	He/ 2 mL/min
Injection temperature	280°C	Injection temperature	300°C
Oven programme	80°C(1min) 20°C/min to 220°C(0min) 5°C/min to 232°C(0min) 30°C/min to 300°C(3 min)	Oven programme	120°C(1min) 30°C/min to 300°C(5min)
Interface temperature	280°C	Interface temperature	300°C
Ion source and MS parameters			
Source temperature	230°C	Source temperature	230°C
Electron energy	70 eV	Electron energy	70 eV
Analyser temperature	150°C	Analyser temperature	150°C
Collision gas/Flow	He/ 2.25 mL/min N <sub>2</sub> / 1.5 mL/min	Collision gas/Flow	He/ 2.25 mL/min N <sub>2</sub> / 1.5 mL/min
Acquisition mode	MRM	Acquisition mode	MRM
Solvent delay	6.5 min	Solvent delay	5.4 min
Dwell time	10 ms	Dwell time	50 ms

Table S2: Calculated theoretical abundances for the fragmentation of PCB compounds

Number of Cl	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Abundance	Number of Cl	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Abundance	Number of Cl	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Abundance	
3	258.0	186.0	0.66128	6	359.8	287.9	0.33199	7	399.8	325.9	0.28232	
		188.0	0.33873			289.9	0.66801			327.9	0.57143	
	260.0	186.0	0.32798		361.8	287.9	0.06602			329.9	0.14626	
		188.0	0.67202			289.9	0.53141			327.9	0.46875	
	291.9	219.9	0.49697			291.9	0.40257			329.9	0.47990	
		221.9	0.50303			289.9	0.19761			331.9	0.05135	
4	293.9	219.9	0.16399			363.8	291.9		0.59879	403.8	329.9	0.70039
		221.9	0.66399				293.9		0.20359		331.9	0.29961
		223.9	0.17201		291.9		0.39370		355.8		0.24924	
	295.9	221.9	0.49110		365.8	293.9	0.53543		427.8	357.8	0.75076	
		223.9	0.50889			295.9	0.07087			355.8	0.03547	
		253.9	0.39806			293.9	0.65388			357.8	0.42734	
5	325.9	255.9	0.60194	367.8	295.9	0.34612	429.8	359.8	0.53719			
		253.9	0.09879		321.9	0.28473		357.8	0.10629			
	327.9	255.9	0.59759		393.8	323.9		0.71527	431.8	359.8	0.53443	
		257.9	0.30362			321.9		0.04724		361.8	0.35928	
		255.9	0.29523			323.9		0.47466		359.8	0.21224	
	329.9	257.9	0.59995		395.8	325.9		0.47810	433.8	361.8	0.57075	
259.9		0.10477	323.9	0.14149		363.8	0.21701					
257.9		0.58876	397.8	325.9		0.57006	435.8	361.8		0.35293		
259.9		0.41125		327.9		0.28846		363.8		0.53676		
							365.8	0.11031				

Table S3: Calculated theoretical abundances for the fragmentation of PBDE compounds

Number of Br	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Abundance	Number of Br	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Abundance	Number of Br	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Abundance
3	405.8	245.9	0.66441	5	565.6	403.7	0.29798	7	717.4	557.6	0.28530
		247.9	0.33559			405.7	0.59995			559.6	0.71469
	407.8	245.9	0.33108			567.6	407.7		0.10202	719.4	557.6
		247.9	0.66892		405.7		0.59519		559.6		0.47555
	438.7	323.8	0.49873		639.5	407.7	0.40481		561.6		0.47699
		325.8	0.50127			479.7	0.33277		559.6	0.14228	
4	485.7	323.8	0.16554	6	641.5	481.7	0.66723	721.4	561.6	0.57085	
		325.8	0.66554			479.7	0.06639		563.6	0.28687	
	487.7	327.8	0.16892		643.5	481.7	0.53252	723.4	561.6	0.28427	
		325.8	0.49622			483.7	0.40108		563.6	0.57143	
5	561.6	401.7	0.39919	645.5	481.7	0.19899	725.4	563.6	0.47301		
		403.7	0.60081		483.7	0.59949		565.6	0.14429		
	563.6	401.7	0.09949	647.5	483.7	0.39732	727.4	563.6	0.47301		
		403.7	0.59899		485.7	0.20151		565.6	0.47778		
	405.7	0.30152	487.7	0.06846	567.6	0.04921	567.6	0.29179			
	485.7	0.66113	487.7	0.33887							

Table S4: Theoretical ratios and uncertainties for the fragmentation of PCBs

Number of Cl	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)	Number of Cl	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)
3	258.0	186.0/188.0	1.9523	0.0030	7	393.8	321.9/323.9	0.39807	0.00013
	260.0	186.0/188.0	0.48806	0.00076		395.8	321.9/323.9	0.09952	0.00008
	291.9	219.9/221.9	0.98794	0.00073			321.9/325.9	0.09880	0.00008
4	293.9	219.9/221.9	0.24699	0.00036		323.9/325.9	0.99280	0.00044	
		219.9/223.9	0.9534	0.0029		397.8	323.9/325.9	0.24820	0.00021
	221.9/223.9	3.860	0.010	323.9/327.9			0.49050	0.00057	
	295.9	221.9/223.9	0.9650	0.0021			325.9/327.9	1.9763	0.0017
5	325.9	253.9/255.9	0.66130	0.00034		399.8	325.9/327.9	0.49406	0.00051
	327.9	253.9/255.9	0.16532	0.00018			325.9/329.9	1.9303	0.0043
		253.9/257.9	0.32539	0.00047		327.9/329.9	3.9070	0.0078	
		255.9/257.9	1.9682	0.0021		401.8	327.9/329.9	0.9768	0.0015
	329.9	255.9/257.9	0.49206	0.00068			327.9/331.9	9.129	0.057
255.9/259.9		2.818	0.012	329.9/331.9			9.347	0.057	
6	331.9	257.9/259.9	5.727	0.022		403.8	329.9/331.9	2.3377	0.0096
		257.9/259.9	1.4316	0.0040		427.8	355.8/357.8	0.33199	0.00009
		359.8	287.9/289.9	0.49698	0.00019		355.8/357.8	0.08300	0.00005
	361.8	287.9/289.9	0.12424	0.00011	429.8	355.8/359.8	0.06603	0.00004	
		287.9/291.9	0.16400	0.00016		357.8/359.8	0.79552	0.00028	
		289.9/291.9	1.32003	0.00084		431.8	357.8/359.8	0.19888	0.00014
		289.9/291.9	0.33001	0.00035	357.8/361.8		0.29583	0.00025	
	363.8	289.9/293.9	0.9706	0.0018	433.8	359.8/361.8	1.48750	0.00082	
		291.9/293.9	2.9412	0.0045		359.8/361.8	0.37187	0.00031	
		365.8	291.9/293.9	0.7353	0.0010	359.8/363.8	0.9780	0.0013	
291.9/295.9	5.555		0.029	435.8	361.8/363.8	2.6301	0.0029		
293.9/295.9	7.555		0.038		361.8/363.8	0.65751	0.00067		
367.8	293.9/295.9	1.8892	0.0065		361.8/365.8	3.1994	0.0084		
						363.8/365.8	4.866	0.012	

Table S5: Theoretical ratios and uncertainties for the fragmentation of PBDEs

Number of Br	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)	Number of Br	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)
3	405.8	245.9/247.9	1.9798	0.0010	6	643.5	481.7/483.7	0.33193	0.00012
	407.8	245.9/247.9	0.49495	0.00025			481.7/485.7	0.98748	0.00061
	438.7	323.8/325.8	0.99493	0.00024			483.7/485.7	2.9750	0.0015
4	485.7	323.8/325.8	0.24873	0.00012		483.7/485.7	0.74373	0.00035	
		323.8/327.8	0.9800	0.0010		483.7/487.7	5.804	0.011	
		325.8/327.8	3.9400	0.0036		485.7/487.7	7.804	0.014	
5	487.7	325.8/327.8	0.98499	0.00071		647.5	485.7/487.7	1.9510	0.0024
	561.6	401.7/403.7	0.66441	0.00011		717.4	557.6/559.6	0.39919	0.00004
	563.6	401.7/403.7	0.16610	0.00006		719.4	557.6/559.6	0.09980	0.00003
		401.7/405.7	0.32997	0.00016			557.6/561.6	0.09950	0.00003
		403.7/405.7	1.98657	0.00072			559.6/561.6	0.99697	0.00015
	565.6	403.7/405.7	0.49664	0.00023		721.4	559.6/561.6	0.24924	0.00007
		403.7/407.7	2.9207	0.0042	559.6/563.6		0.49597	0.00019	
		405.7/407.7	5.8810	0.0080	561.6/563.6		1.98993	0.00057	
	567.6	405.7/407.7	1.4703	0.0014	723.4	561.6/563.6	0.49748	0.00017	
	639.5	479.7/481.7	0.49873	0.00007		561.6/565.6	1.9701	0.0015	
641.5	479.7/481.7	0.12468	0.00004	563.6/565.6		3.9601	0.0027		
	479.7/483.7	0.16554	0.00005	563.6/565.6		0.99002	0.00050		
	481.7/483.7	1.32772	0.00028	563.6/567.6	9.612	0.022			
6	641.5				725.4	565.6/567.6	9.709	0.022	
						565.6/567.6	9.709	0.022	
						727.4	565.6/567.6	2.4271	0.0037

Table S6: Experimental ratios for PCBs at 10 ppm

Number of Cl	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)	Number of Cl	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)
3	258	186.0/188.0	1.9300	0.0023	7	393.8	321.9/323.9	0.39777	0.00098
	260	186.0/188.0	0.48167	0.00050		395.8	321.9/323.9	0.09826	0.00048
	291.9	219.9/221.9	0.9788	0.0021			321.9/325.9	0.09913	0.00042
4	293.9	219.9/221.9	0.24449	0.00093		397.8	323.9/325.9	1.0089	0.0013
		219.9/223.9	0.9407	0.0042			323.9/325.9	0.2468	0.0014
		221.9/223.9	3.848	0.012			323.9/327.9	0.4879	0.0026
	295.9	221.9/223.9	0.9595	0.0032		325.9/327.9	1.9769	0.0039	
5	325.9	253.9/255.9	0.66275	0.00039		399.8	325.9/327.9	0.4914	0.0034
	327.9	253.9/255.9	0.16536	0.00032			325.9/329.9	1.917	0.025
		253.9/257.9	0.3269	0.0012			327.9/329.9	3.901	0.035
		255.9/257.9	1.9772	0.0050		327.9/329.9	0.9753	0.0084	
	329.9	255.9/257.9	0.4931	0.0015		401.8	327.9/331.9	9.14	0.24
		255.9/259.9	2.840	0.012			329.9/331.9	9.09	0.28
		257.9/259.9	5.760	0.016		403.8	329.9/331.9	2.260	0.057
	331.9	257.9/259.9	1.442	0.011		427.8	355.8/357.8	0.328	0.0020
	6	359.8	287.9/289.9	0.50050	0.00055	429.8	355.8/357.8	0.08217	0.00084
		361.8	287.9/289.9	0.12497	0.00035		355.8/359.8	0.06447	0.00081
287.9/291.9			0.16589	0.00057	357.8/359.8		0.7846	0.0021	
289.9/291.9			1.3274	0.0030	431.8	357.8/359.8	0.1978	0.0013	
363.8		289.9/291.9	0.3311	0.0020	431.8	357.8/361.8	0.2900	0.0021	
		289.9/293.9	0.9800	0.0058		359.8/361.8	1.4665	0.0059	
		291.9/293.9	2.9597	0.0015	433.8	359.8/361.8	0.3657	0.0022	
365.8		291.9/293.9	0.7376	0.0065	433.8	359.8/363.8	0.948	0.010	
		291.9/295.9	5.594	0.065		361.8/363.8	2.593	0.013	
		293.9/295.9	7.584	0.077	435.8	361.8/363.8	0.6494	0.0045	
367.8	293.9/295.9	1.899	0.037	435.8	361.8/365.8	3.121	0.036		
						363.8/365.8	4.805	0.061	

Table S7: Experimental ratios for PBDEs at 10 ppm

Number of Br	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)	Number of Br	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)	
3	405.8	245.9/247.9	2.030	0.023	6	643.5	481.7/483.7	0.335	0.010	
	407.8	245.9/247.9	0.5082	0.0042			481.7/485.7	1.001	0.029	
438.7	323.8/325.8	1.014	0.016	483.7/485.7			2.991	0.072		
4	485.7	323.8/325.8	0.2453	0.0082		645.5	483.7/485.7	0.769	0.013	
		323.8/327.8	1.000	0.013		483.7/487.7	6.33	0.36		
		325.8/327.8	4.079	0.094		485.7/487.7	8.24	0.52		
	487.7	325.8/327.8	0.9871	0.0053		647.5	485.7/487.7	2.00	0.10	
5	561.6	401.7/403.7	0.657	0.016		7	717.4	557.6/559.6	0.373	0.063
	563.6	401.7/403.7	0.1662	0.0033			719.4	557.6/559.6	0.080	0.042
		401.7/405.7	0.3260	0.0038				557.6/561.6	0.081	0.040
		403.7/405.7	1.961	0.030	559.6/561.6			1.018	0.030	
	565.6	403.7/405.7	0.4989	0.0023	721.4		559.6/561.6	0.250	0.019	
		403.7/407.7	2.946	0.054			559.6/563.6	0.491	0.022	
		405.7/407.7	5.90	0.10			561.6/563.6	1.971	0.081	
	567.6	405.7/407.7	1.465	0.017	723.4		561.6/563.6	0.489	0.027	
6	639.5	479.7/481.7	0.479	0.024	725.4		561.6/565.6	1.97	0.21	
	641.5	479.7/481.7	0.1225	0.0042			563.6/565.6	4.01	0.24	
		479.7/483.7	0.1653	0.0049		563.6/565.6	1.02	0.10		
		481.7/483.7	1.349	0.036	563.6/567.6	11.0	2.2			
					727.4	565.6/567.6	10.9	2.6		
							2.57	0.52		

Table S8: Experimental ratios for PCBs at 20 ppm

Number of Cl	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)	Number of Cl	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)
3	258	186.0/188.0	1.9212	0.0029	7	393.8	321.9/323.9	0.3986	0.0016
	260	186.0/188.0	0.48157	0.00040		321.9/323.9	0.09827	0.00047	
4	291.9	219.9/221.9	0.9784	0.0023		395.8	321.9/325.9	0.09937	0.00060
	293.9	219.9/221.9	0.24386	0.00055			323.9/325.9	1.0112	0.0029
		219.9/223.9	0.9366	0.0028		397.8	323.9/325.9	0.2482	0.0010
	221.9/223.9	3.8408	0.0069	323.9/327.9			0.4899	0.0031	
295.9	221.9/223.9	0.9595	0.0026	325.9/327.9		1.9735	0.0054		
5	325.9	253.9/255.9	0.66398	0.00068		399.8	325.9/327.9	0.4930	0.0031
	327.9	253.9/255.9	0.16610	0.00023			325.9/329.9	1.915	0.020
		253.9/257.9	0.32767	0.00037		327.9/329.9	3.884	0.018	
		255.9/257.9	1.9727	0.0016		401.8	327.9/329.9	0.9709	0.0072
	255.9/257.9	0.4919	0.0020	327.9/331.9			9.06	0.25	
	329.9	255.9/259.9	2.848	0.012		329.9/331.9	9.30	0.29	
		257.9/259.9	5.789	0.025		403.8	329.9/331.9	2.390	0.079
	331.9	257.9/259.9	1.4376	0.0051	427.8	355.8/357.8	0.32837	0.00087	
6	359.8	287.9/289.9	0.50181	0.00082	8	429.8	355.8/357.8	0.08184	0.00044
	361.8	287.9/289.9	0.12508	0.00034			355.8/359.8	0.06455	0.00033
		287.9/291.9	0.16605	0.00052		357.8/359.8	0.7887	0.0015	
	363.8	289.9/291.9	1.3275	0.0023		431.8	357.8/359.8	0.1974	0.0010
		289.9/291.9	0.33163	0.00091			357.8/361.8	0.28951	0.00066
	365.8	289.9/293.9	0.9803	0.0039		359.8/361.8	1.4668	0.0045	
291.9/293.9		2.9560	0.0059	433.8		359.8/361.8	0.3669	0.0024	
291.9/293.9		0.7352	0.0061			359.8/363.8	0.9531	0.0088	
291.9/295.9		5.633	0.089	361.8/363.8		2.598	0.011		
367.8	293.9/295.9	7.66	0.12	435.8		361.8/363.8	0.6486	0.0058	
	293.9/295.9	1.898	0.036		361.8/365.8	3.106	0.013		
						363.8/365.8	4.789	0.051	

Table S9: Experimental ratios for PBDEs at 20 ppm

Number of Br	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)	Number of Br	Precursor ion (m/z)	Product ions (m/z)	Ratio	s(ratio)
3	405.8	245.9/247.9	2.0365	0.0072	6	643.5	481.7/483.7	0.332	0.016
	407.8	245.9/247.9	0.5034	0.0059			481.7/485.7	0.995	0.033
4	438.7	323.8/325.8	1.004	0.015			483.7/485.7	3.002	0.066
	485.7	323.8/325.8	0.2502	0.0039		483.7/485.7	0.7336	0.0076	
		323.8/327.8	0.988	0.018		483.7/487.7	6.22	0.34	
		325.8/327.8	3.949	0.042		485.7/487.7	8.47	0.46	
487.7	325.8/327.8	0.9812	0.0032	647.5	485.7/487.7	1.954	0.024		
5	561.6	401.7/403.7	0.6510	0.0098	7	717.4	557.6/559.6	0.399	0.060
	563.6	401.7/403.7	0.1639	0.0025			557.6/559.6	0.080	0.011
		401.7/405.7	0.3226	0.0067		719.4	557.6/561.6	0.084	0.015
		403.7/405.7	1.968	0.027			559.6/561.6	1.044	0.074
		565.6	403.7/405.7	0.4926		0.0079	721.4	559.6/561.6	0.2421
	403.7/407.7		2.905	0.054		559.6/563.6		0.502	0.016
	405.7/407.7		5.898	0.083		561.6/563.6		2.08	0.11
567.6	405.7/407.7	1.455	0.025	723.4	561.6/563.6	0.501	0.025		
6	639.5	479.7/481.7	0.495		0.019	561.6/565.6	2.20	0.18	
	641.5	479.7/481.7	0.1226		0.0067	563.6/565.6	4.40	0.32	
		479.7/483.7	0.1649		0.0077	563.6/565.6	0.985	0.050	
		481.7/483.7	1.345		0.031	563.6/567.6	10.6	3.3	
					725.4	565.6/567.6	10.8	3.2	
					727.4	565.6/567.6	2.40	0.27	

**Figure S1.** Fragmentation patterns of PCBs (top spectrum) and PBDEs (bottom spectrum).

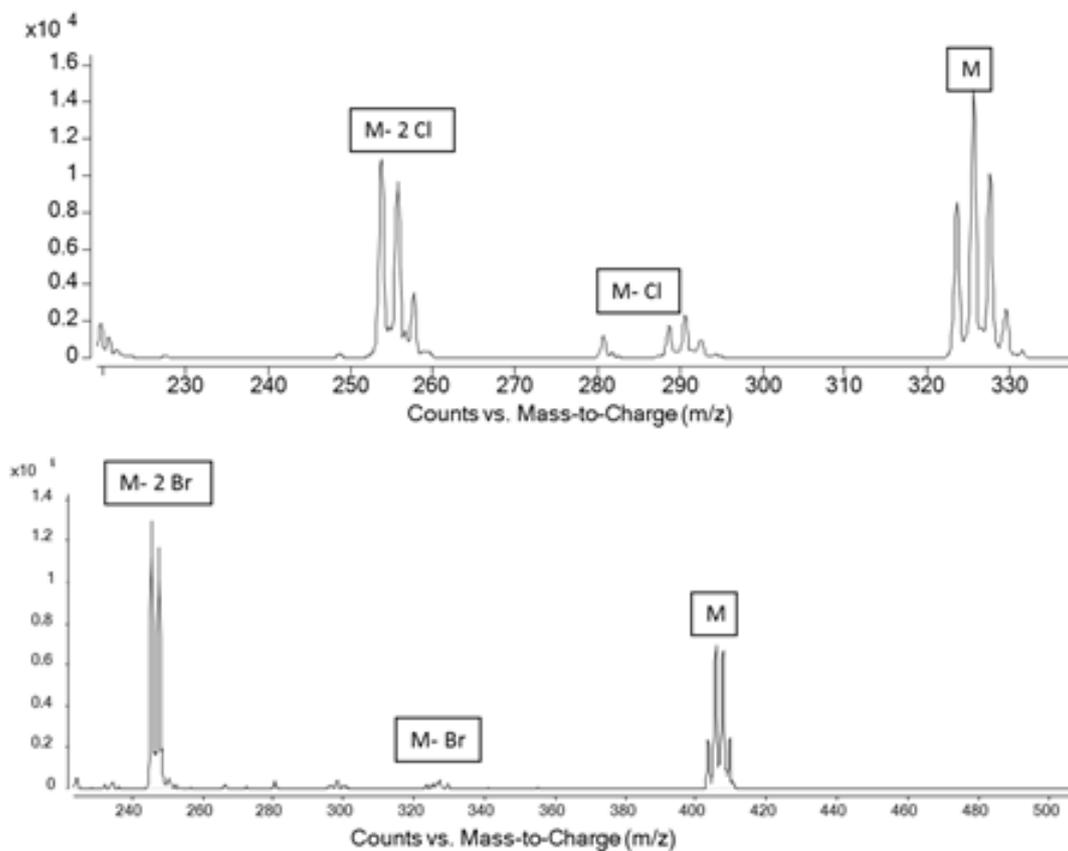
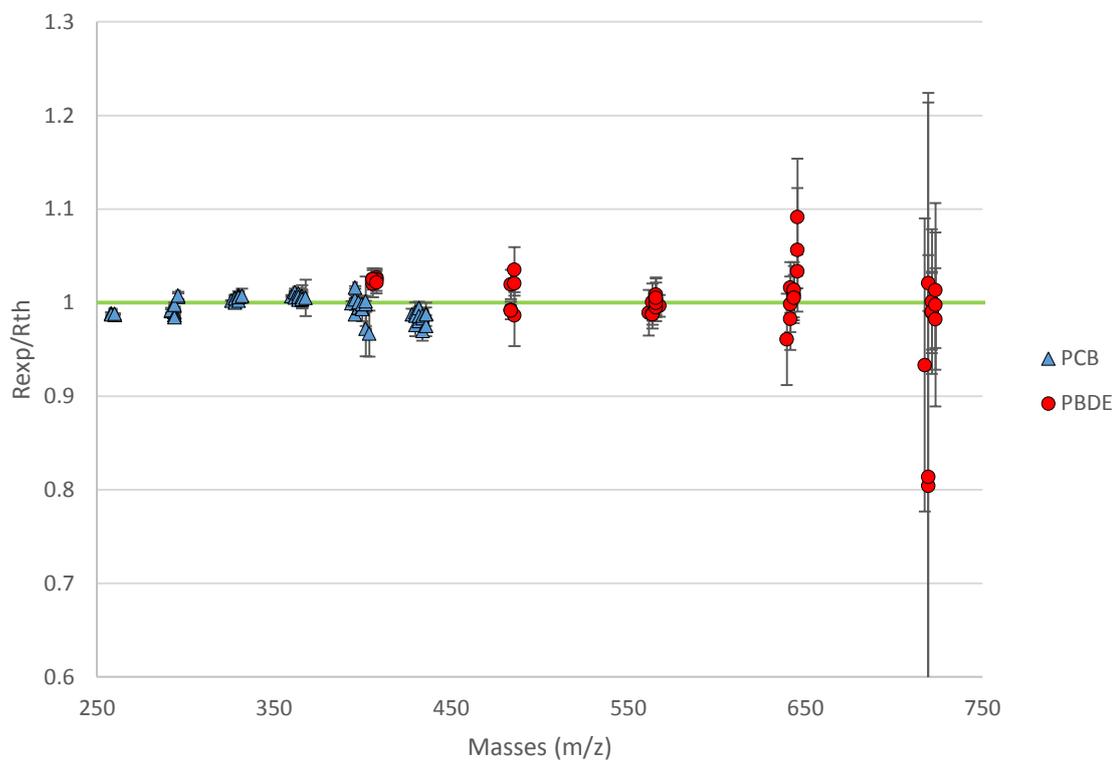


Figure S2. Spectral accuracy at 10 ppm



**4. 3 Comparación entre diferentes técnicas de espectrometría de masas para la determinación de bifenilos policlorados mediante dilución isotópica utilizando análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$**

**Artículo científico 3: Comparison of different mass spectrometric techniques for the determination of polychlorinated biphenyls by isotope dilution using  $^{37}\text{Cl}$ -labelled analogues**

Lourdes Somoano-Blanco, Pablo Rodríguez-González, Daniel Pröfrock, Andreas Prange, and J. Ignacio García Alonso.

*Analytical Methods*, 2015, 7, 9068-9075.

### 4.3.1 Introducción

Las técnicas más utilizadas hoy en día para la determinación de PCBs en muestras reales están basadas en el acoplamiento de la Cromatografía de Gases con la Espectrometría de Masas. Dentro de este acoplamiento, existen diversas posibilidades en cuanto a la fuente de ionización y el analizador de masas empleado.

Una de las fuentes de ionización más utilizadas es la fuente de ionización electrónica (EI) que se ha utilizado ampliamente en la determinación de PCBs mediante dilución isotópica empleando compuestos enriquecidos en  $^{13}\text{C}$ , ya que la marca isotópica se conserva tras la fragmentación en la fuente.

Por otra parte, la fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) se ha utilizado ampliamente en el campo del análisis de especiación elemental. Se considera una fuente de ionización “dura” ya que es capaz de atomizar e ionizar todos los elementos que constituyen los compuestos a analizar. Sin embargo, el elevado potencial de ionización que presentan los halógenos se traduce en una baja eficiencia de ionización de modo que el uso de esta fuente en la determinación de compuestos halogenados es muy limitada. Además, la fuente ICP suelen presentar problemas de selectividad generados por interferencias espectrales. Para eliminar este tipo de interferencias procedentes del propio plasma de ionización o de compuestos generados en el mismo, se han desarrollado en los últimos años equipos ICP-MS/MS de triple cuadrupolo, donde se utiliza un gas reactivo para generar especies por reacción con el elemento de interés.

Considerada una fuente intermedia entre las fuentes duras y blandas, se encuentra también la fuente de ionización química negativa (NCI). Este tipo de fuente proporciona una buena sensibilidad en la determinación de compuestos halogenados, sin embargo, presenta problemas de selectividad en muestras complejas, debido a la respuesta que proporcionan todos los compuestos halogenados presentes en la matriz analizada.

Con la síntesis de PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  (ver el [artículo científico 1](#)) ha sido posible utilizar las fuentes elementales ICP y NCI en la determinación y cuantificación de PCBs en muestras sólidas, y comparar sus prestaciones analíticas con la fuente EI. Por tanto, en este capítulo se presenta una comparación entre distintos equipos de masas, con distintas fuentes de ionización utilizando los PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$

sintetizados en el artículo científico 1 de la presente Tesis. Para las fuentes elementales ICP y NCI se han llevado a cabo las correcciones matemáticas pertinentes en la medida de las relaciones isotópicas de Cl, como son la discriminación de masa y el tiempo muerto del detector. En todos los casos se ha utilizado la regresión lineal múltiple como herramienta matemática para la cuantificación de los PCBs.

### 4.3.2 Objetivos

A lo largo del estudio comparativo entre distintas técnicas de espectrometría de masas para la determinación de PCBs, mediante IMDS utilizando análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ , se han perseguido una serie de objetivos parciales, como son:

- Estudio de la medida de la relación isotópica  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  en los equipos GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS y GC-NCI-MS.
- Determinación del enriquecimiento isotópico y de la concentración de la mezcla de PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ -PCBs mediante GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS y GC-NCI-MS.
- Determinación de PCBs en el material de referencia certificado NIST 1941b (sedimento marino) utilizando análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  y regresión lineal múltiple mediante GC-EI-MS/MS, GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS y GC-NCI-MS.

## 4. 3. 3 Artículo científico 3

## Comparison of different mass spectrometric techniques for the determination of polychlorinated biphenyls by isotope dilution using $^{37}\text{Cl}$ -labelled analogues

Lourdes Somoano-Blanco, Pablo Rodríguez-González, Daniel Pröfrock, Andreas Prange, J. Ignacio García Alonso.

*Analytical Methods*, 2015, 7, 9068-9075.

Analytical  
Methods



PAPER

View Article Online  
View Journal | View Issue



Cite this: *Anal. Methods*, 2015, 7, 9068

### Comparison of different mass spectrometric techniques for the determination of polychlorinated biphenyls by isotope dilution using $^{37}\text{Cl}$ -labelled analogues†

Lourdes Somoano-Blanco,<sup>a</sup> Pablo Rodríguez-González,<sup>a,b</sup> Daniel Pröfrock,<sup>a,b</sup> Andreas Prange<sup>b</sup> and J. Ignacio García Alonso<sup>a</sup>

This work presents the comparison of four different mass spectrometric techniques coupled to gas chromatography (single quadrupole ICP-MS, triple quadrupole ICP-MS/MS, single quadrupole NCI-MS and triple quadrupole EI-MS/MS) for the detection of polychlorinated biphenyls (PCBs) in environmental samples and their determination by a new isotope dilution mass spectrometry (IDMS) approach. A mixture of twelve priority PCBs labeled with  $^{37}\text{Cl}$  was employed as the species-specific isotopically labeled internal standard. The  $^{37}\text{Cl}$ -labeled PCBs enable the use of both molecular and elemental ionization sources, such as ICP or NCI, as the isotopic label is in the heteroatom. First, the comparison was carried out by assessing the capabilities of all instruments to measure chlorine isotope ratios and calculating the isotopic enrichment of the labeled analogues. Finally, the analysis of the Certified Reference Material SRM 1941b (organics in marine sediment) containing PCBs in the low  $\text{ng g}^{-1}$  range was carried out for method comparison. Elemental ionization sources such as ICP and NCI combined with quadrupole mass spectrometry provided chlorine specific detection and high sensitivity for higher chlorinated compounds but suffered from high background signals from other chlorine containing, co-eluting compounds in the sample which prevented the accurate measurement of PCB-specific chlorine isotope ratios. On the other hand, the use of GC-MS/MS in the selected reaction monitoring mode (SRM) provided selective and accurate measurements but suffered from lower sensitivity for higher chlorinated compounds.

Received 6th July 2015  
Accepted 12th September 2015  
DOI: 10.1039/c5ay01752a  
www.rsc.org/methods

### Introduction

PCBs are a group of 209 structurally related chemical compounds (congeners) that constitute a class of ubiquitous pollutants with aromatic structure, high chemical stability and extremely poor water solubility.<sup>1</sup> Although their manufacture has stopped already in 1977,<sup>2</sup> these toxic compounds are distributed at a global scale through atmospheric transport and can be found in almost every environmental compartment including air, water, sediments, fish and mammals as well as in every region of the world.<sup>3,4</sup> For these reasons, the development of reliable methods for PCB determination in environmental samples is still highly important.<sup>5</sup>

PCBs have been mainly determined in real samples using gas chromatography (GC) coupled to electron capture detection (ECD) or mass spectrometry (MS).<sup>6</sup> GC coupled to ECD or negative chemical ionization (NCI-MS) provides high sensitivity but suffers from a lack of selectivity as all chlorinated compounds present in the sample matrix are detected.<sup>7-9</sup> In contrast, the use of electron ionization (EI) coupled to MS using the selective ion monitoring mode (SIM) increases selectivity as only analyte-specific molecular fragments are detected. GC coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) with EI using selected reaction monitoring (SRM) mode enhances even more the selectivity of PCB determination compared to SIM.<sup>10</sup>

The coupling of GC to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has been established as a powerful hyphenated technique in trace element speciation analysis,<sup>11</sup> particularly for the determination of volatile organometallic contaminants based on the element-specific determination of the heteroatom present in the molecule.<sup>12</sup> However, the determination of relevant halogenated contaminants by GC/ICP-MS is very limited<sup>13-17</sup> due to the high ionization potential of halogen atoms, their low ionization efficiency in an argon

<sup>a</sup>Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain. E-mail: rodrguarp@uniovi.es  
<sup>b</sup>Wahlholz-Zentrum Gatzschach, Centre for Materials and Coastal Research, Institute of Coastal Research, Department for Marine Bioanalytical Chemistry, Altr-Hand-Straße 1, D-21532 Gatzschach, Germany. E-mail: daniel.proefrock@agude  
† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ay01752a

**COMPARISON OF DIFFERENT MASS SPECTROMETRIC TECHNIQUES FOR THE DETERMINATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS BY ISOTOPE DILUTION USING <sup>37</sup>Cl-LABELLED ANALOGUES**

**Lourdes Somoano-Blanco<sup>a</sup>, Pablo Rodríguez-González<sup>a\*</sup>, Daniel Pröfrock<sup>b\*</sup>, Andreas Prange<sup>b</sup>, J. Ignacio García Alonso<sup>a</sup>.**

<sup>a</sup>Department of Physical and Analytical Chemistry. Faculty of Chemistry. University of Oviedo. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.

<sup>b</sup>Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Centre for Materials and Coastal Research. Institute for Coastal Research. Department for Marine Bioanalytical Chemistry. Max-Planck-Strasse 1, D-21502 Geesthacht, Germany.

\*Authors for correspondence: [rodriguezpablo@uniovi.es](mailto:rodriguezpablo@uniovi.es) ; [daniel.proefrock@hzg.de](mailto:daniel.proefrock@hzg.de)

**ABSTRACT**

This work presents the comparison of four different mass spectrometric techniques coupled to gas chromatography (single quadrupole ICP-MS, triple quadrupole ICP-MS/MS, single quadrupole NCI-MS and triple quadrupole EI-MS/MS) for the detection of Polychlorinated biphenyls (PCBs) in environmental samples and their determination by a new isotope dilution mass spectrometry (IDMS) approach. A mixture of twelve priority PCBs labelled with <sup>37</sup>Cl was employed as species-specific isotopically labelled internal standard. The <sup>37</sup>Cl-labelled PCBs enable the use of both molecular and elemental ionization sources, such as ICP or NCI, as the isotopic label is in the heteroatom. First, the comparison was carried out by assessing the capabilities of all instruments to measure chlorine isotope ratios and calculating the isotopic enrichment of the labelled analogues. Finally, the analysis of the Certified Reference Material SRM 1941b (organics in marine sediment) containing PCBs at the low ng g<sup>-1</sup> range was carried out for method comparison. Elemental ionization sources such as ICP and NCI combined with quadrupole mass spectrometry provided chlorine specific detection and high sensitivity for the higher chlorinated compounds but suffered from high

background signals from other chlorine containing, co-eluting compounds in the sample which prevented the accurate measurement of the PCB-specific chlorine isotope ratios. On the other hand, the use of GC-MS/MS in the selected reaction monitoring mode (SRM) provided selective and accurate measurements but suffered from lower sensitivity for the higher chlorinated compounds.

## INTRODUCTION

PCBs are a group of 209 structurally related chemical compounds (congeners) that constitute a class of ubiquitous pollutants with aromatic structure, high chemical stability and extremely poor water solubility.<sup>1</sup> Although their manufacture has stopped already in 1977,<sup>2</sup> these toxic compounds are distributed at a global scale through atmospheric transport and can be found in almost every environmental compartment including air, water, sediments, fish and mammals as well as in every region of the world.<sup>3-4</sup> For these reasons, the development of reliable methods for PCBs determination in environmental samples is still highly important.<sup>5</sup>

PCBs have been mainly determined in real samples using gas chromatography (GC) coupled to electron capture detection (ECD) or mass spectrometry (MS).<sup>6</sup> GC coupled to ECD or negative chemical ionization (NCI-MS) provides high sensitivity but suffer from a lack of selectivity as all chlorinated compounds present in the sample matrix are detected.<sup>7-9</sup> In contrast, the use of electron ionization (EI) coupled to MS using the selective ion monitoring mode (SIM) increases selectivity as only analyte-specific molecular fragments are detected. GC coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) with EI using selected reaction monitoring (SRM) mode enhances even more the selectivity of PCBs determination compared to SIM.<sup>10</sup>

The coupling of GC to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has been established as powerful hyphenated technique in trace element speciation analysis,<sup>11</sup> particularly for the determination of volatile organometallic contaminants based on the element-specific determination of the heteroatom present in the molecule.<sup>12</sup> However, the determination of relevant halogenated contaminants by GC-ICP-MS is very limited<sup>13-17</sup> due to the high ionisation potential of halogen atoms, their low ionization efficiency in an argon plasma as well as different strong polyatomic interferences formed inside the plasma. For these reasons, GC-ICP-MS has never been applied to the determination of PCBs. Indeed, the only publication that can be found in the literature dealing with the determination of PCBs by ICP-MS is based on the use of electrothermal vaporization with the aim of differentiating “organic” chlorine and inorganic chlorine.<sup>18</sup> The use of ICP-MS instruments equipped with collision cells has been demonstrated to be an efficient approach to remove spectral interferences and decrease the detection limits of phosphorus, sulphur, bromine and chlorine or iodine containing compounds when analysed by GC-ICP-MS.<sup>13</sup> The recent commercialisation of triple quadrupole systems with the ICP source (ICP-QqQ) allows the improved resolution of problematic spectral interferences<sup>19-20</sup> when operated in MS/MS mode but it has not been evaluated as a GC detector thus far.

Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) provides accurate and precise determinations directly traceable to the International System of Units.<sup>21</sup> The determination of PCBs by IDMS has been traditionally carried out using multiply <sup>13</sup>C labelled analogues and methodological calibration graphs where the labelled analogues are employed as internal standards.<sup>22</sup> We have recently presented the synthesis of <sup>37</sup>Cl-labelled PCBs and their application to the IDMS determination of PCBs in solid samples by GC-EI-MS/MS.<sup>23</sup> The use of <sup>37</sup>Cl-labelled analogues has been shown to

provide analytical figures of merit comparable to those obtained using  $^{13}\text{C}$ -labelled compounds as internal standards. On the other hand, the use of  $^{37}\text{Cl}$ -labelled compounds allows for the selection of alternative ionization sources, both elemental and molecular. We present here for the first time the comparison of three different ionization sources (EI, NCI and ICP) and four different MS techniques (GC-MS, GC-MS/MS, GC-ICP-MS and GC-ICP-MS/MS) for the detection of PCBs in solid samples and the determination of selected PCBs by IDMS using their  $^{37}\text{Cl}$ -labelled analogues. For this purpose, we carried out the evaluation of the different ion sources and mass spectrometer configurations for the characterization of a set of twelve  $^{37}\text{Cl}$ -labelled congeners in terms of isotopic measurements. Finally, the analysis of the certified reference material SRM 1941b (marine sediment) was performed to evaluate the capabilities of the different mass spectrometric techniques for the accurate determination of selected PCBs at the low  $\text{ng g}^{-1}$  levels in real samples by IDMS.

#### EXPERIMENTAL SECTION

**Reagents and Materials.** A  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  solution of twelve PCBs (congeners 18, 28, 31, 44, 52, 101, 118, 138, 149, 153, 180, 194) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCBs mixture was synthesised in our laboratory as reported elsewhere.<sup>23</sup> Working standard solutions of labelled and unlabelled PCBs were prepared in isooctane (Sigma-Aldrich) and stored in the dark at  $4^\circ\text{C}$  until use. Hexane and acetone were obtained from (Sigma-Aldrich). Florisil was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). PTFE-coated magnetic stirring bars and 10 mL glass vessels employed for the microwave extractions were purchased from CEM Corporation (Matthews, NC, USA). Cu powder was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The standard reference material SRM 1941b (organics in marine sediment) was

obtained from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA).

#### **Instrumentation.**

Gas chromatography was coupled in this work to four different mass spectrometric techniques. A single quadrupole Agilent 7700 (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) was coupled to a GC model 6890 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with a cold on-column injector and a DB-5MS column (15m × 0.25 mm i.d. × 0.1 µm film thickness) from Agilent (Santa Clara, USA). The same gas chromatograph was also coupled to an Agilent 8800 triple quadrupole ICP-MS (Agilent Technologies). A single quadrupole GC-MS model QP2010 Plus (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a NCI source, a split/splitless injector and a DB-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) was also employed. Finally a gas chromatograph model Agilent 7890A (Agilent Technologies) fitted with a split/splitless injector and a DB-5MS capillary column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) was coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole Mass Spectrometer equipped with an EI source. Operating conditions of all mass spectrometric techniques are summarized in Tables S1, S2 and S3 of the Electronic Supporting Information. The extraction of the PCBs from the solid sample was carried out by a focused microwave Explorer-12-Hybrid system (CEM Corporation). The centrifugation of the samples was performed using a centrifuge model CENTRO-8 BL (JP Selecta, Barcelona, Spain). An analytical balance model AB204-S (Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) was used for the gravimetric preparation of all solutions and standards, while a mini-vap evaporator/concentrator (Supelco, St. Louis, MO, USA) was used for the evaporation of the sample extracts to their final volume before injection.

#### **Procedures.**

#### **Sample preparation for PCBs determination in the marine sediment SRM 1941b.**

The sample preparation procedure has been already described in a previous publication.<sup>23</sup> Briefly, the extraction of PCBs from the solid samples was carried out by focused microwave assisted extraction. Weighed amounts of sample and spike (approximately 0.1 g of sample and 0.1 g of a 7 ng g<sup>-1</sup> solution of the isotopically labelled PCBs mixture) were added directly to a disposable 10 mL glass vial in which the focused microwave assisted extraction is carried out. The extraction solvent employed for the analysis of the marine sediment SRM 1941b was a 1:1 mixture of hexane and acetone. After microwave irradiation the extracts were centrifuged at 3000 rpm for 5 minutes. Then, 0.3 g of Cu powder was added to remove residual sulphur which is present in the sample. To assist the sulphur removal the sample was sonicated for 30 min. In addition, all the extracts were cleaned with a Florisil column. Finally the extracts were preconcentrated with a gentle nitrogen flow until a volume of approximately 50 µL. Please note that the accurate knowledge of the final volume is not required by IDMS.

#### **Measurement of the isotopic composition of the samples by the different mass spectrometric techniques.**

When using elemental ion sources such as ICP or NCI with a single quadrupole mass analyser, the elemental chlorine isotope ratio <sup>37</sup>Cl/<sup>35</sup>Cl was measured. For the ICP measurements in the single quadrupole instrument He was employed as collision gas to remove the spectral interference <sup>36</sup>Ar<sup>1</sup>H on <sup>37</sup>Cl. When the samples were measured by triple quadrupole ICP-MS/MS, hydrogen was used as reaction gas. Therefore, chlorine isotope ratios were measured as the ratio of <sup>37</sup>Cl-H<sub>2</sub> (m/z 39) and <sup>35</sup>Cl-H<sub>2</sub> (m/z 37). When using the GC-MS/MS system with an EI source, the SRM transitions for the natural abundance and <sup>37</sup>Cl-labelled PCBs as well as the

collision energies employed for collision induced dissociation (CID) were those reported elsewhere.<sup>23</sup>

**Target PCB congeners.** A set of twelve PCB congeners was selected to carry out the comparison of the different MS techniques. This set included the six non-dioxin-like PCBs congeners 28, 52, 101, 138, 153 and 180 that are considered as indicators by the EFSA (European Food Safety Authority), the ‘dioxin-like’ congener PCB 118, to which a toxic equivalency factor has been assigned by the World Health Organization, and five other congeners relevant due to their widespread presence in the environment (18, 31, 44, 149 and 194). This group of congeners is listed in the International Standard IEC 61619-1997 for the determination of PCBs by capillary GC in insulating liquids.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Measurement of elemental chlorine isotope ratios by GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS and GC-NCI-MS.

First, the precision and accuracy of the measurement of the compound-specific chlorine isotope ratios  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  were evaluated by GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS and GC-NCI-MS. For this purpose, five independent injections of a mixture of the natural abundance PCBs were carried out with each technique. The concentration of the natural abundance standard employed was  $200 \text{ ng g}^{-1}$  when using the ICP-MS instruments whereas three different concentration levels ( $100$ ,  $500$  and  $1000 \text{ ng g}^{-1}$ ) were tested when using the NCI source. The detector dead time was corrected in all measurements and the final results obtained are given in Table 1. A significant mass discrimination effect was observed when using the GC-ICP-MS and GC-ICP-MS/MS instruments. When comparing the experimental values with the theoretical  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  isotope ratio, the

relative error varied from 0.6% to 11.2% by GC-ICP-MS and from 2.8% to 11.9% by GC-ICP-MS/MS, respectively. The precision obtained calculated as relative standard deviation (RSD%) from three GC injections ranged from 2.3% to 11.2% by GC-ICP-MS and from 2.7% to 10% by GC-ICP-MS/MS. A much better accuracy and precision was obtained when using the GC-NCI-MS system. The relative error obtained in the isotope ratio for all congeners ranged from 0.01% to 2.6% while the RSD values ranged from 0.1% to 0.7%. In addition, we did not observed any difference in the measured isotope ratios at the three levels of concentration tested, indicating that an adequate detector dead time correction was applied and the absence of other detector effects within the concentration range tested.

**Table 1.** Compound-specific  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  isotope ratios measured by GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS and GC-NCI-MS in a standard mixture containing twelve natural abundance PCB congeners. The uncertainty of the values corresponds to the standard deviation of n=5 injections. The theoretical value of the  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  isotope ratio was established as 0.3200. Results with GC-NCI-MS are given at three different concentration levels (100, 500 and 1000 ng g<sup>-1</sup>).

PCBs Congeners	GC-ICP-MS 200 ng g <sup>-1</sup>	GC-ICP-MS/MS 200 ng g <sup>-1</sup>	GC-NCI-MS 100 ng g <sup>-1</sup>	GC-NCI-MS 500 ng g <sup>-1</sup>	GC-NCI-MS 1000 ng g <sup>-1</sup>
PCB-18	0.343 ± 0.014	0.329 ± 0.020	0.3229 ± 0.0012	0.3236 ± 0.0015	0.3283 ± 0.0016
PCB-28+31	0.337 ± 0.012	0.345 ± 0.015	0.3246 ± 0.0005	0.3191 ± 0.0017	0.3222 ± 0.0021
PCB-52	0.341 ± 0.011	0.356 ± 0.036	0.3235 ± 0.0002	0.3222 ± 0.0015	0.3265 ± 0.0016
PCB-44	0.322 ± 0.009	0.331 ± 0.018	0.3227 ± 0.0007	0.3208 ± 0.0017	0.3248 ± 0.0016
PCB-101	0.330 ± 0.028	0.348 ± 0.026	0.3241 ± 0.0004	0.3222 ± 0.0016	0.3262 ± 0.0017
PCB-118	0.349 ± 0.010	0.358 ± 0.025	0.3229 ± 0.0002	0.3208 ± 0.0017	0.3250 ± 0.0018
PCB-149	0.317 ± 0.036	0.349 ± 0.020	0.3253 ± 0.0003	0.3236 ± 0.0017	0.3276 ± 0.0016
PCB-153	0.338 ± 0.013	0.342 ± 0.014	0.3237 ± 0.0004	0.3220 ± 0.0018	0.3266 ± 0.0016
PCB-138	0.350 ± 0.008	0.349 ± 0.014	0.3234 ± 0.0003	0.3202 ± 0.0018	0.3249 ± 0.0020
PCB-180	0.359 ± 0.023	0.356 ± 0.010	0.3238 ± 0.0008	0.3216 ± 0.0019	0.3266 ± 0.0017
PCB-194	0.341 ± 0.013	0.352 ± 0.018	0.3236 ± 0.0006	0.3222 ± 0.0015	0.3272 ± 0.0016

##### **Determination of the isotope enrichment of $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCBs.**

The isotopic enrichment of  $^{37}\text{Cl}$  in the different  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCB congeners contained in the spike solution employed in this work was calculated on the basis of the results obtained by all the different techniques. The values obtained by GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS and GC-NCI-MS were directly calculated from the detector dead time and mass bias corrected measurement of the compound-specific  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  isotope ratio. Mass bias was corrected by external bracketing injecting a natural abundance standard containing the twelve target PCBs congeners every three samples. The isotopic enrichments obtained by GC-EI-MS/MS<sup>23</sup> were calculated as described elsewhere.<sup>24</sup> Briefly, the isotope distribution of each congener is compared with theoretically derived spectra calculated for different tentative isotope enrichments. The best isotope enrichment was that which provided the minimum in the square sum of residuals for the linear regression between the theoretical and experimental spectra. In all cases the uncertainty of the values corresponds to the standard deviation of  $n=5$  independent GC injections. The results obtained are given in Table 2. As can be seen, most of the isotopic enrichments obtained agree well between all techniques. We only found significant differences when comparing the values obtained by GC-NCI-MS and GC-EI-MS/MS in four congeners, mainly due to low standard deviation of the values in comparison with those obtained using GC-ICP-MS and GC-ICP-MS/MS.

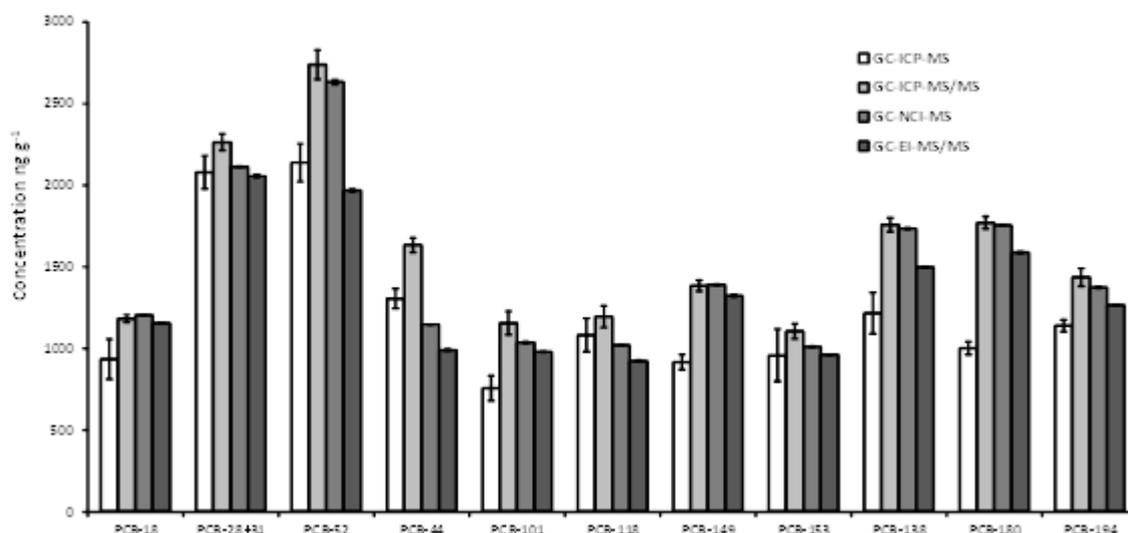
**Table 2.** Isotopic enrichment (at% of  $^{37}\text{Cl}$ ) for the different  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCB congeners. The values obtained by GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS and GC-NCI-MS were calculated from the measurement of the  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  isotope ratio whereas the values calculated by GC-EI-MS/MS were calculated as described elsewhere.<sup>24</sup> Uncertainty of the values corresponds to the standard deviation of n=5 independent GC injections.

PCBs Congeners	GC-ICP-MS	GC-ICP-MS/MS	GC-NCI-MS	GC-EI-MS/MS <sup>23</sup>
PCB-18	93.98 ± 0.68	93.50 ± 0.43	94.30 ± 0.11	94.14 ± 0.06
PCB-28+31	94.06 ± 0.23	93.65 ± 0.41	93.83 ± 0.09	94.05 ± 0.04
PCB-52	94.25 ± 0.25	94.59 ± 0.51	94.42 ± 0.02	94.16 ± 0.03
PCB-44	94.38 ± 0.56	93.78 ± 1.99	94.36 ± 0.06	94.06 ± 0.03
PCB-101	94.48 ± 0.23	94.16 ± 1.76	94.13 ± 0.30	94.06 ± 0.06
PCB-118	94.21 ± 0.74	92.93 ± 1.81	93.93 ± 0.12	93.99 ± 0.03
PCB-149	92.27 ± 0.61	91.95 ± 0.66	92.49 ± 0.07	92.51 ± 0.02
PCB-153	93.57 ± 0.84	92.00 ± 1.64	92.70 ± 0.29	92.70 ± 0.03
PCB-138	93.56 ± 0.38	92.54 ± 1.13	92.71 ± 0.04	92.70 ± 0.03
PCB-180	92.13 ± 0.47	91.59 ± 0.67	91.91 ± 0.06	91.93 ± 0.03
PCB-194	91.25 ± 0.46	91.34 ± 0.60	91.65 ± 0.08	91.45 ± 0.03

#### Determination of the $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCBs concentration by reverse IDMS.

The concentration of the  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCBs contained in the spike solution employed in this work was carried out by reverse IDMS. For each of the instruments tested, three independent blends of the spike solution and a natural abundance standard containing all target congeners were prepared and injected each in triplicate. The concentrations obtained by GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS and GC-NCI-MS were calculated applying the classical IDMS equation using the compound specific  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  isotope ratio. The concentrations obtained by GC-EI-MS/MS were calculated by multiple linear regression as described elsewhere.<sup>23</sup> Figure 1 shows the comparison of the results obtained with

the four techniques. As can be observed, significant differences between the different MS techniques were obtained for all congeners. As there are no reference values for this spike solution we cannot discuss on the accuracy of the different measurements. Therefore, technique-specific concentrations of the labelled PCBs were employed for the subsequent analysis of the certified reference material 1941b.



**Figure 1.** Concentration of the  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCBs contained in the spike solution employed in this work calculated by reverse IDMS using four different techniques (GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS, GC-NCI-MS and GC-EI-MS/MS). Error bars correspond to the standard deviation of three independent blends of the spike solution and the natural abundance standard containing all target congeners.

#### **Analysis of the certified reference material SRM 1941b (marine sediment).**

We have previously demonstrated<sup>23</sup> that the use of a 1:1 mixture of hexane and acetone and a focused microwave assisted extraction at 70°C for 4 minutes provided quantitative recoveries for all target congeners present in the certified sediment SRM 1944 in a concentration range from 11 to 80 ng g<sup>-1</sup>. Therefore the same sample preparation procedure was employed here for the analysis of the sediment SRM 1941b. However, it is important to highlight that the concentration level of the target PCB congeners in this

material ranged from 1 to 8 ng g<sup>-1</sup>. It is also important to note that, besides the twelve target PCBs, this material provides also certified values for 30 additional PCB congeners as well as 7 chlorinated pesticides.

When using the GC-ICP-MS system (single quadrupole) helium was employed as collision gas to remove spectral interferences. However, preliminary analyses of this material showed that the sensitivity obtained was not enough to perform a reliable quantification of the target PCBs at the SRM 1941b concentration range. In addition to the low sensitivity, the coelution of other chlorinated compounds prevented integration of most target congeners. Therefore, we could not provide concentration values for this material using GC-ICP-MS. It is worth stressing that the use of a 30m column instead of a 15 m column might significantly improve the chromatographic resolution.

Figure 2 shows the comparison of the certified values with the experimental values obtained in the analysis of SRM 1941b using GC-ICP-MS/MS, GC-NCI-MS and GC-EI-MS/MS. For GC-ICP-MS/MS analyses, H<sub>2</sub> was employed as reaction gas to remove spectral interferences through the formation of <sup>37</sup>Cl-H<sub>2</sub> (m/z 39) and <sup>35</sup>Cl-H<sub>2</sub> (m/z 37).

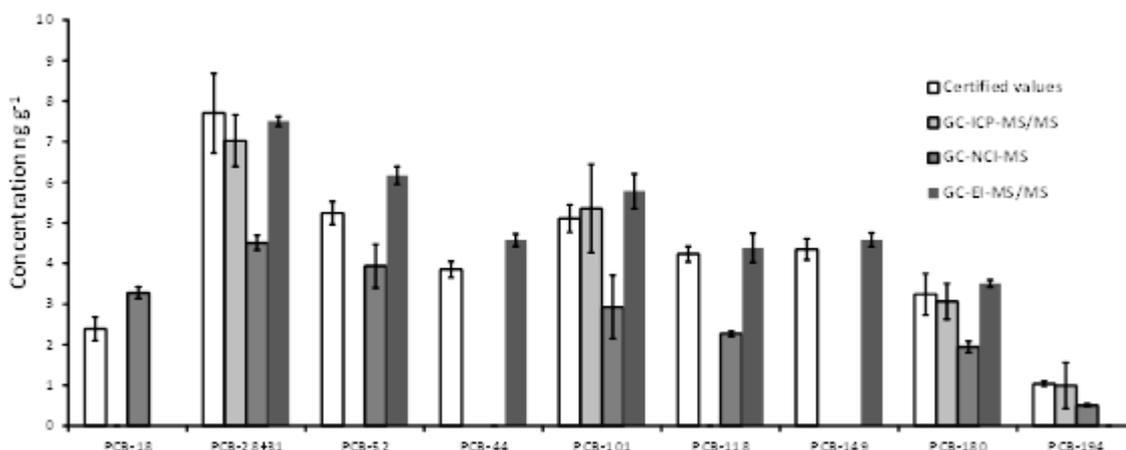
Figure 3 shows a GC-ICP-MS/MS chromatogram of the SRM 1941b spiked with the mixture of <sup>37</sup>Cl-labelled PCBs. The chromatogram for transition <sup>35</sup>Cl → <sup>35</sup>Cl-H<sub>2</sub> shows that the signal to noise ratio is not satisfactory and that the presence of other chlorinated compounds hampers the proper integration of many of the target congeners. In contrast, the chromatogram for the transition <sup>37</sup>Cl → <sup>37</sup>Cl-H<sub>2</sub> shows a much better signal to noise ratio. Under these conditions, we could only determine experimental concentrations for PCB 28+31, 101, 180 and 194 and, as can be observed in Figure 2, they were in good agreement with the certified values. However, the RSD values obtained from three

independent extractions ranged from 9 to 57%. Here the further improvement of the chromatographic separation conditions in term of resolution (e.g. using a 30m column length) might help to minimize possible coelution and therefore will improve the integration of the targeted compounds.

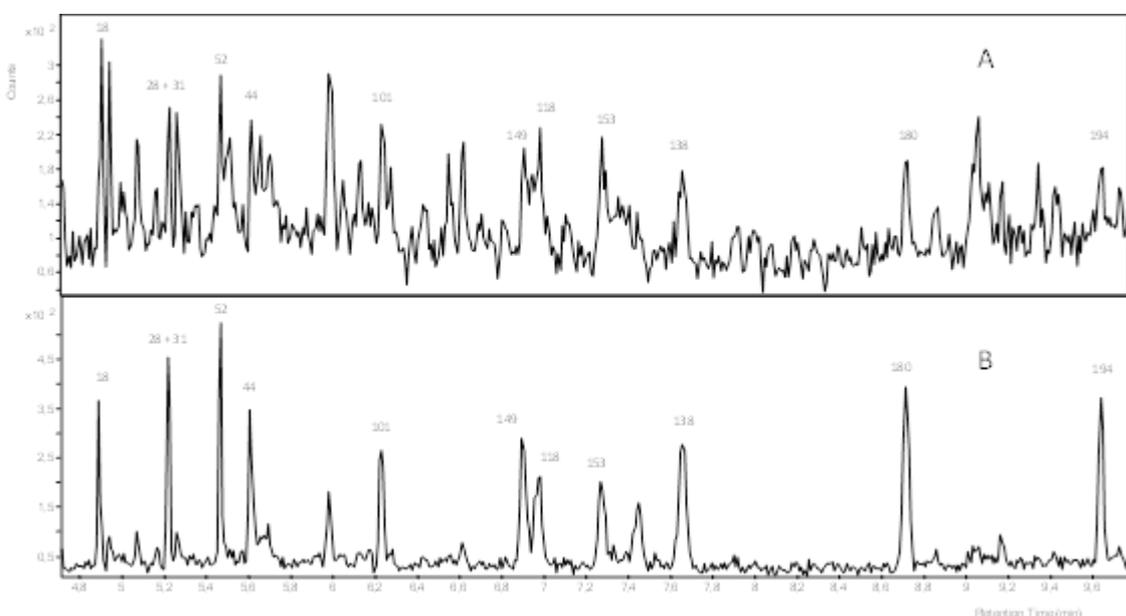
Figure 4 shows that the GC-NCI-MS system provides, among all the evaluated techniques, the highest sensitivity for PCBs determination in SRM 1941b. However, the presence of other chlorinated compounds and an important background at  $m/z$  35, hampered the proper integration of several congeners such as 138, 153 and 149. The results obtained using this technique for the rest of congeners are also shown in Figure 2. As can be seen, we could not provide any concentration in agreement with the certified values of the material probably due to the high background at  $m/z$  35. The RSD values obtained from three independent extractions ranged from 4 to 27%.

Finally, Figure 5 shows that the GC-EI-MS/MS system provided the best signal to noise ratio and a very low background both for the natural abundance and for the labelled analogues at the selected transitions. Using this technique, sequential detection windows based on the elution time and the PCB chlorination degree are programmed. In this way the only interference that may affect the analyte peak can only be due to a PCB congener with the same chlorination degree. As can be observed in Figure 5, GC-EI-MS/MS allowed the accurate integration of all target congeners except for PCB 18, 153 and 138. Also, the concentration of PCB 194 was too low to provide an accurate integration. It is worth noting that none of the MS techniques employed in this work allowed us to obtain concentration values for PCB 153 and 138, indicating that the quantification problem for these congeners is due to an incomplete chromatographic separation rather than an instrumental limitation. Figure 2 shows that GC-EI-MS/MS

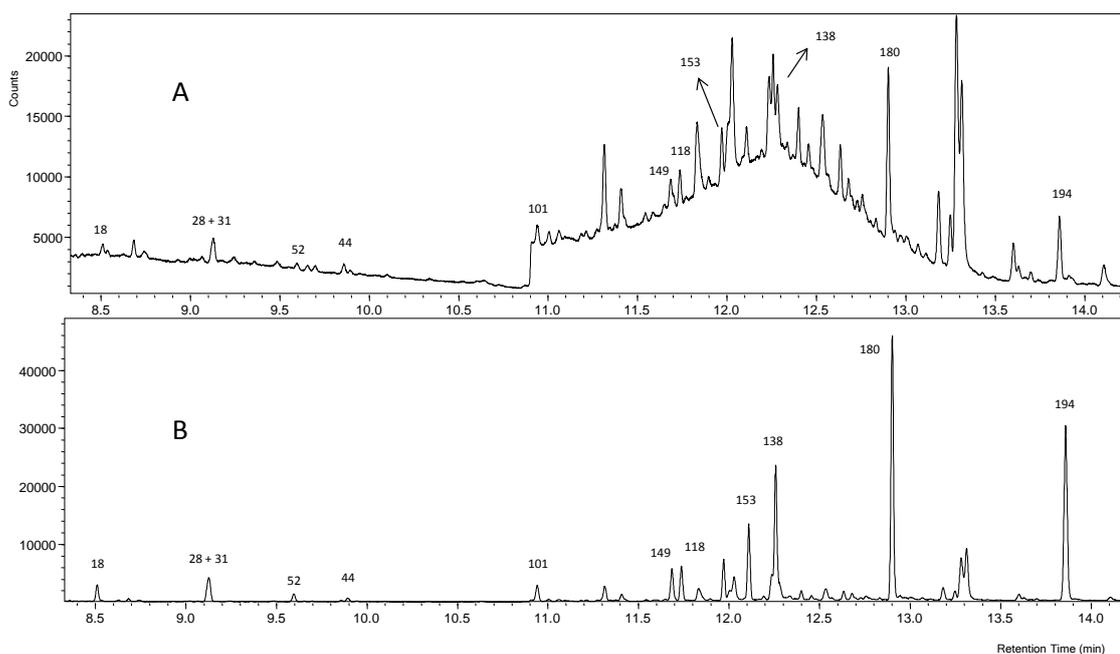
provided concentrations in good agreement with the certified values for the rest of the target PCBs with a precision ranging from 1.6 to 8.1% (RSD).



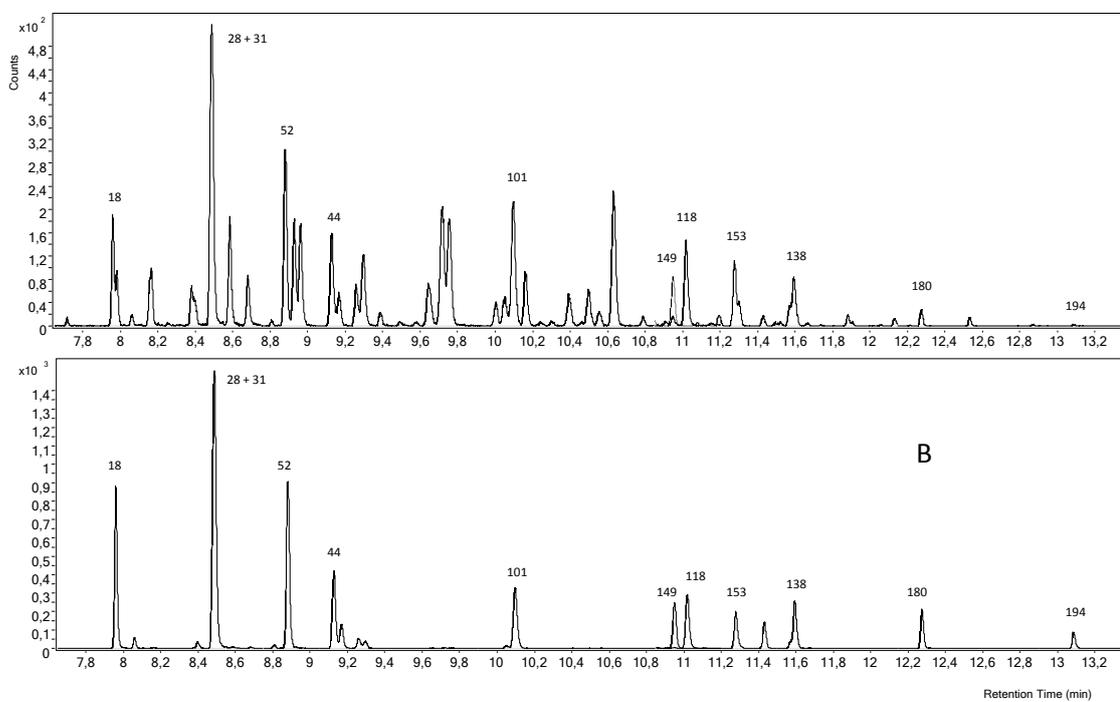
**Figure 2.** Comparison of the certified values and the experimental concentrations of the target PCBs obtained in the analysis of the SRM 1941 b (Organics in Marine Sediment) using three different techniques (GC-ICP-MS/MS, GC-NCI-MS and GC-EI-MS/MS). Error bars correspond to the standard deviations n=3 independent extractions.



**Figure 3.** GC-ICP-MS/MS chromatogram of the certified reference sediment SRM 1941b spiked with the mixture of <sup>37</sup>Cl-labelled PCBs. A) chromatogram for transition <sup>35</sup>Cl → <sup>35</sup>Cl-H<sub>2</sub> and B) chromatogram for transition <sup>37</sup>Cl → <sup>37</sup>Cl-H<sub>2</sub>.



**Figure 4.** GC-NCI-MS chromatogram of the certified reference sediment SRM 1941b spiked with the mixture of  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCBs. A) chromatogram for  $^{35}\text{Cl}$  and B) chromatogram for  $^{37}\text{Cl}$ .



**Figure 5.** GC-EI-MS/MS chromatogram of the certified reference sediment SRM 1941b spiked with the mixture of  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCBs. A) chromatogram of the transitions for the natural abundance PCBs and B) chromatogram of the transitions for the  $^{37}\text{Cl}$ -labelled analogues.

## CONCLUSIONS

Using  $^{37}\text{Cl}$ -labelled PCBs it is possible to employ different ionization sources and mass analyzers to determine PCBs by IDMS. In this way, it is possible to compare the capabilities of different ion sources and mass analyzers coupled to GC. This work has shown that GC-EI-MS/MS is the technique that provides more accurate and precise results in the analysis of real samples as the SRM mode provides the most specific detection for each PCB congener. A higher instrumental sensitivity is obtained when using GC-NCI-MS, but the interferences due to the presence of other co-eluting chlorinated compounds and the high background at  $m/z$  35 prevented its application to real samples at low concentration levels. Nevertheless, it is worth commenting that accurate and precise compound specific isotope ratios were obtained by GC-NCI-MS. Finally, according to our results, the use of GC-ICP-MS and GC-ICP-MS/MS for the determination of PCBs offers no advantages over the more traditional GC-EI-MS/MS technique. Although we could obtain experimental concentrations in agreement with the certified values for 5 congeners in the analysis of SRM 1941b, the signal to noise ratio and the precision of the results was poor in comparison with GC-EI-MS/MS. In addition, the precision obtained in the measurement of compound-specific chlorine isotope ratio in standards was not satisfactory, in comparison with that obtained by GC-NCI-MS. Here further instrumental improvements and optimizations might help to enhance the sensitivity and to further reduce the present interferences. Also the optimization of the

chromatographic conditions with respect to improve the resolution and therefore the separation between targeted PCBs and co eluting as well as co extracted chlorinated compounds will help to improve the performance of the different setups in the future.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through Project CTQ2012-36711 (cofounded by FEDER) is acknowledged. Additional funding for a research stay of Lourdes Somoano Blanco provided by the Helmholtz-Zentrum Geesthacht is also acknowledged. The UE is acknowledged for the provision of FEDER funds for the purchase of the GC-MS/MS instrument. P. Rodríguez-González acknowledges his research contract RYC-2010-06644 to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the Ramón y Cajal Program.

#### REFERENCES

- [1] B.D. Rodan, D.W. Pennington, N. Eckley and R. Boethling, *Environ. Sci. Technol.*, 1999, **33**, 3482.
- [2] K.J. Kelly, E. Connelly, G.A. Reinhold, M. Byrne and D.J. Prezant, *Arch. Environ. Health*, 2002, **57**, 282.
- [3] A. Beyer and M. Biziuk, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2009, **201**, 137.
- [4] K. Jaraczewska, J. Lulek, A. Covaci, S. Voorspoels, A. Kaluba-Skotarczak, K. Drews and P. Schepens, *Sci. Total Environ.*, 2006, **372**, 20.
- [5] H.P. Tang, *TRAC-Trend. Anal. Chem.*, 2013, **45**, 48.
- [6] S.P.J. van Leeuwen and J. de Boer. *J. Chromatogr. A.*, 2008, **1186**, 161.
- [7] C. Danielsson, K. Wiberg, P. Korytár, S. Bergek, U.A.T. Brinkman and P. Haglund, *J. Chromatogr. A.*, 2005, **1086**, 61.
- [8] M. Ramil-Criado, D. Hernanz-Fernández, I. Rodríguez-Pereiro and R. Cela-Torrijos, *J. Chrom. A.*, 2004, **1056**, 187.

- [9] H. Kontzas and K. Pekari, *J. Chromatogr. B.*, 2003, **791**, 117.
- [10] P. Plaza Bolaños, A. Garrido Frenich, and J.L. Martinez Vidal, *J. Chromatogr. A.*, 2007, **1167**, 9.
- [11] M. Popp, S. Hann and G. Koellensperger, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **668**, 114.
- [12] Bouyssiere, J. Szpunar and R. Lobinski, *Spectrochim. Acta Part B*, 2002, **57**, 805.
- [13] D. Pröfrock, P. Leonhard, S. Wilbur and A. Prange, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, **19**, 623.
- [14] N. Fidalgo-Used, M. Montes-Bayon, E. Blanco-Gonzalez and A. Sanz-Medel. *Talanta*, 2008, **75**, 710.
- [15] A. Gonzalez-Gago, J. M. Marchante-Gayon and J. I. Garcia Alonso, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 1138.
- [16] J. L. Gomez-Ariza, T. Garcia-Barrera and F. Lorenzo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, **20**, 883.
- [17] J. L. Gomez-Ariza and T. Garcia-Barrera, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 884.
- [18] Richner and S. Wunderli, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1993, **8**, 45.
- [19] S. Diez Fernández, N. Sugishama, J. Ruiz Encinar and A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 5851.
- [20] L. Balcaen, G. Woods, M. Resano and F. Vanhaecke, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 33.
- [21] J.I. García Alonso and P. Rodríguez González in *Isotope Dilution Mass Spectrometry*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2013.
- [22] T. Otake, Y. Aoyagi, T. Yarita and M. Numata, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **397**, 2569.
- [23] L. Somoano-Blanco, P. Rodriguez-Gonzalez, S. García Fonseca, J.I. Garcia Alonso, *Anal. Chem.*, 2015, **87**, 7840.
- [24] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González and J. I. García Alonso, *J. Mass Spectrom.*, 2014, **49**, 681.

## SUPPORTING INFORMATION

COMPARISON OF DIFFERENT MASS SPECTROMETRIC TECHNIQUES FOR THE DETERMINATION OF POLYCHLORINATED BIPHENYLS BY ISOTOPE DILUTION USING  $^{37}\text{Cl}$ -LABELLED ANALOGUES

Lourdes Somoano-Blanco<sup>a</sup>, Pablo Rodríguez-González<sup>a\*</sup>, Daniel Pröfrock<sup>b\*</sup>, Andreas Prange<sup>b</sup>, J. Ignacio García Alonso<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Department of Physical and Analytical Chemistry. Faculty of Chemistry. University of Oviedo. Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.

<sup>b</sup>Helmholtz-Zentrum Geesthacht, Centre for Materials and Coastal Research. Institute for Coastal Research. Department for Marine Bioanalytical Chemistry. Max-Planck-Strasse 1, D-21502 Geesthacht, Germany.

\*Authors for correspondence: [rodriguezpablo@uniovi.es](mailto:rodriguezpablo@uniovi.es) ; [daniel.proefrock@hzg.de](mailto:daniel.proefrock@hzg.de)

**Table S1.** Experimental conditions employed in the GC-ICP-MS and GC-ICP-MSMS instruments.

GAS CHROMATOGRAPHY PARAMETERS		
Model	Agilent 6890	
Column	DB-5MS (15 m, 0.25 mm, 0.1 $\mu\text{m}$ )	
Injection mode	Cool On-column	
Injection volume	1 $\mu\text{L}$	
Carrier gas flow	2.6 mL min <sup>-1</sup> (He)	
Injection temperature	280°C	
Oven program	100°C(2min); 30°C/min to 195°C(0 min); 5°C/min to 210°C(0 min); 30°C/min to 300°C(8.83 min)	
Interface temperature	300 °C	
ION SOURCE AND MS PARAMETERS		
	GC-ICP-MS	GC-ICP-MS/MS
Model	Agilent 7700	Agilent 8800
Rf power	900	800
Carrier gas flow rate	0.95 L min <sup>-1</sup>	0.95 L min <sup>-1</sup>
Auxiliary gas	30 Psi (N <sub>2</sub> )	30 Psi (N <sub>2</sub> )

<b>pressure</b>		
<b>Collision gas flow</b>	2 mL min <sup>-1</sup> (He)	
<b>Reaction Gas flow</b>		2 mL min <sup>-1</sup> (H <sub>2</sub> )
<b>m/z measured</b>	35, 37	35→37, 37→39
<b>Ion lens setting</b>	Daily optimization	

**Table S2.** Experimental conditions employed in the GC-NCI-MS instrument.

<b>GC AND INTERFACE PARAMETERS</b>	
<b>Model</b>	Shimadzu QP2010 Plus
<b>Column</b>	DB-5MS (30m, 0.25mm, 0.25 μm)
<b>Injection mode</b>	Splitless
<b>Sampling time</b>	0.50 min
<b>Injection volume</b>	2 μL
<b>Carrier gas/Flow</b>	He/ 2 mL/min
<b>Injection temperature</b>	280°C
<b>Oven programme</b>	80°C(1min); 20°C/min to 220°C(0min); 5°C/min to 232°C(0min); 30°C/min to 300°C(3 min)
<b>Interface temperature</b>	280°C
<b>ION SOURCE AND MS PARAMETERS</b>	
<b>Source temperature</b>	230°C
<b>Source voltage</b>	70 eV
<b>Emission current</b>	150 μA
<b>Reagent gas</b>	CH <sub>4</sub>
<b>Solvent delay</b>	4 min
<b>Acquisition mode</b>	SIM
<b>Selected m/z</b>	35 and 37

**Table S3.** Experimental conditions employed in the GC-EI-MSMS instrument.

<b>CHROMATOGRAPHIC PARAMETERS</b>	
<b>Chromatograph</b>	7890A Agilent Technologies
<b>Column</b>	DB-5MS (30 m x 0.25 mm i.d. x 250 μm coating)
<b>Carrier gas</b>	He (2 mL/min)

<b>Injection mode</b>	Splitless (2 min of purge time)
<b>Injector temperature</b>	280°C
<b>Temperature program</b>	80°C (1min), 220°C (0 min) at 20°C/min; 232°C (0 min) at 5°C/min; 300°C (3 min) at 30°C/min
<b>DETECTOR PARAMETERS</b>	
<b>Detector</b>	Agilent 7000
<b>Ionization current</b>	35 $\mu$ A
<b>Ionization energy</b>	70 eV
<b>Source temperature</b>	230°C
<b>Interface temperature</b>	280°C



**4. 4 Determinación simultánea de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del Hexabromociclododecano en aguas mediante dilución isotópica y espectrometría de masas utilizando análogos enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$**

**Artículo científico 4: Simultaneous determination of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -Hexabromocyclododecane diastereoisomers in water samples by isotope dilution mass spectrometry using  $^{81}\text{Br}$ -labeled analogs**

Lourdes Somoano-Blanco, Pablo Rodriguez-Gonzalez, Giuseppe Centineo,  
Sergio García Fonseca, and J. Ignacio Garcia Alonso.

*Journal of Chromatography A*, 2016, 1429, 230-237.

#### **4.4.1 Introducción**

Uno de los retardantes de llama más utilizados en los últimos años ha sido el hexabromociclododecano (HBCD). Existen un total de 16 diastereoisómeros del HBCD de fórmula molecular  $C_{12}H_{18}Br_6$ , y dentro de estos diastereoisómeros, existen 6 parejas de enantiómeros y 4 formas meso. Las mezclas comerciales presentan tres diastereoisómeros mayoritarios ( $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HBCD). El HBCD ha sido utilizado como aditivo piroretardante, principalmente en el poliestireno expandido para planchas aislantes en edificios y vehículos. También se ha utilizado en revestimientos textiles y equipos eléctricos y electrónicos. Es por tanto una sustancia ampliamente utilizada en los últimos años y se encuentra presente en multitud de objetos cotidianos.

El HBCD presenta un elevado potencial para la bioacumulación, y en recientes estudios se ha valorado su toxicidad y sus posibles efectos carcinogénicos. Por todo ello es necesario su control y determinación en muestras medioambientales y biológicas. Los isómeros del HBCD han sido incluidos en la lista de contaminantes orgánicos persistentes según el Convenio de Estocolmo. Además, en 2013 la Unión Europea, según la Directiva 2013/39/EC estableció un valor promedio de calidad medioambiental de  $1,6 \text{ ng L}^{-1}$  para la suma de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD.

Cuando se quiere determinar los diastereoisómeros del HBCD es necesario utilizar una técnica de separación previa a la detección. A pesar de su volatilidad, la cromatografía de gases (GC) no se puede utilizar debido a que no son estables térmicamente y se descomponen e interconvierten por encima de los  $160^\circ\text{C}$  en el inyector (antes de que tenga lugar la separación cromatográfica), lo que impide la detección de los distintos diastereoisómeros. Por ello, la técnica de separación seleccionada habitualmente es la cromatografía líquida (HPLC), con fuentes a presión atmosférica como electrospray (ESI) o la fuente de presión atmosférica de ionización química (APCI). A la hora de cuantificar se suelen utilizar compuestos enriquecidos en  $^{13}\text{C}$  o  $^2\text{H}$  como patrones internos en las calibraciones metodológicas.

En este artículo científico se ha desarrollado una metodología analítica para la determinación simultánea de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD mediante IDMS utilizando análogos enriquecidos  $^{81}\text{Br}$ . Para ello ha sido necesario llevar a cabo la síntesis, purificación y caracterización de los diastereoisómeros enriquecidos, los cuales no estaban disponibles comercialmente hasta la realización de este capítulo. Utilizando

el modo de adquisición SRM en un equipo LC(ESI)-MS/MS de triple cuadrupolo y regresión lineal múltiple se ha llevado a cabo la cuantificación de los tres diastereoisómeros, sin necesidad de recurrir a una calibración metodológica, lo que minimiza el tiempo de análisis total.

### 4.4.2 Objetivos

La puesta a punto de la metodología para la determinación de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD utilizando análogos enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$  se ha conseguido llevando a cabo los objetivos parciales descritos a continuación:

- Síntesis y purificación de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD enriquecidos isotópicamente en  $^{81}\text{Br}$  para su uso como trazadores en la metodología a desarrollar.
- Caracterización en enriquecimiento isotópico y concentración de la mezcla de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$ .
- Optimización del procedimiento de preparación de muestra y de la separación cromatográfica de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD, previa a su detección, por espectrometría de masas en tándem utilizando el modo SRM.
- Cálculo del límite de cuantificación del método propuesto para cada uno de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD.
- Estudio de recuperaciones de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD en agua ultra-pura y agua de río.

4.4.3 Artículo científico 4

**Simultaneous determination of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -Hexabromocyclododecane diastereoisomers in water samples by isotope dilution mass spectrometry using  $^{81}\text{Br}$ -labeled analogs**

Lourdes Somoano-Blanco, Pablo Rodriguez-Gonzalez, Giuseppe Centineo, Sergio García Fonseca, and J. Ignacio Garcia Alonso.

*Journal of Chromatography A*, 2016, 1429, 230-237.



## Simultaneous determination of $\alpha$ -, $\beta$ - and $\gamma$ -hexabromocyclododecane diastereoisomers in water samples by isotope dilution mass spectrometry using $^{81}\text{Br}$ -labeled analogs



Lourdes Somoano-Blanco<sup>a</sup>, Pablo Rodríguez-González<sup>a,\*</sup>, Giuseppe Centineo<sup>b</sup>, Sergio García Fonseca<sup>b</sup>, J. Ignacio García Alonso<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain  
<sup>b</sup> ISC-Science, Innovative Solutions in Chemistry, S.L., Edificio Científico-Tecnológico Campus de El Cristo, 33006 Oviedo, Spain

### ARTICLE INFO

Article history:  
 Received 29 September 2015  
 Received in revised form 2 December 2015  
 Accepted 15 December 2015  
 Available online 17 December 2015

Keywords:  
 Hexabromocyclododecane diastereoisomers  
 $^{81}\text{Br}$ -labeled analogs  
 Isotope dilution  
 Water samples

### ABSTRACT

This work describes the synthesis, characterization and application of three  $^{81}\text{Br}$ -labeled diastereoisomers of hexabromocyclododecane (HBCD) for the accurate and precise determination of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD in water samples by isotope dilution mass spectrometry. The synthesis of the labeled analogs was carried out by bromination of *cis*, *trans*, *trans*-1,5,9-cyclododecatriene with  $^{81}\text{Br}$ -enriched bromine. After isolation and purification by semipreparative HPLC, each diastereoisomer was characterized in terms of concentration and isotopic enrichment. Then, they were added to the samples to simultaneously quantify the three HBCD diastereoisomers in a single LC-MS/MS injection without resorting to a methodological calibration graph. The results obtained here demonstrate that the use of  $^{81}\text{Br}$ -labeled analogs provides accurate and precise determinations of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD in real water samples. The limits of quantification obtained in real samples for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD were 0.022, 0.073 and 0.015  $\text{ng L}^{-1}$ , respectively, significantly lower than those required by the European Directive 2013/39/EC.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Since more than 30 years, 1,2,5,6,9,10-Hexabromocyclododecane (HBCD) has been worldwide employed as flame retardant due to its ability to reduce the flammability of many consumer products [1]. HBCD is used either as additive or reactive component in a variety of polymers, such as polystyrene foams, high-impact polystyrene or epoxy resins [2]. It is produced industrially by the addition of bromine to *cis-trans-trans*-1,5,9-cyclododecatriene leading to a mixture of three diastereoisomers,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD. Theoretically, 16 different stereoisomers including six pairs of enantiomers as well as 4 meso-forms are possible [3]. Therefore, HBCD is likely to undergo diastereo- and enantio-selective processes in the environment [4]. For example, in sediments  $\gamma$ -HBCD is the most abundant diastereoisomer, but in other matrices, such as biota,  $\alpha$ -HBCD prevails [5,6].

HBCD has been added to the list of Persistent Organic Pollutants of the Stockholm Convention on November 26th, 2014 [7]. Also, in 2013 the EU legislation [8] established an annual environmental quality standard of 1.6  $\text{ng L}^{-1}$  of HBCD (sum of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD)

for inland surface water samples. HBCD can be considered a ubiquitous contaminant. Due to its hydrophobic character, HBCD often accumulates in adipose tissue of biota and it also strongly binds to solid particles such as soil, sediment and sewage sludge [9,10]. Knowledge on the toxicodynamics of HBCD in plants and animals is still rather limited and it is currently difficult to differentiate which diastereoisomer has the highest toxic potential [11].

The instrumental analysis of HBCD mainly relies on mass spectrometric detection coupled to Liquid or Gas Chromatography [12]. The analysis by Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) operated in the electron-capture negative-ion mode is very sensitive but is limited to the total HBCD determination as isomer interconversion may occur at temperatures higher than 160 °C [13]. For this reason, reversed-phase Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) is the preferred choice both using electrospray ionization source (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) as it allows not only diastereoisomer-specific detection but also, when using chiral chromatographic columns it is possible to obtain enantiomer-specific information [14]. It is worth stressing that although high temperatures can be achieved in ESI or APCI sources any isomer interconversion would occur after the chromatographic separation and hence, the identification or quantitation of the analytes are not affected. The use of Solid Phase Extraction for water samples preconcentration [15], the

\* Corresponding author. Fax: +34 985103125.  
 E-mail address: [rodriguezpablo@uniovi.es](mailto:rodriguezpablo@uniovi.es) (P. Rodríguez-González).

**SIMULTANEOUS DETERMINATION OF  $\alpha$ -,  $\beta$ - AND  $\gamma$ -  
HEXABROMOCYCLODODECANE DIASTEREOISOMERS IN WATER  
SAMPLES BY ISOTOPE DILUTION MASS SPECTROMETRY USING  $^{81}\text{Br}$ -  
LABELED ANALOGS**

Lourdes Somoano-Blanco<sup>a</sup>, Pablo Rodriguez-Gonzalez<sup>a\*</sup>, Giuseppe Centineo<sup>b</sup>, Sergio García Fonseca<sup>b</sup> and J. Ignacio Garcia Alonso<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>*Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

<sup>b</sup> *ISC-Science, Innovative Solutions in Chemistry, S.L. Edificio Científico-Tecnológico Campus de "El Cristo" 33006, Oviedo, Spain.*

\*Author for correspondence: [rodriguezpablo@uniovi.es](mailto:rodriguezpablo@uniovi.es)

Phone: +34 985103000 ext-5366

Fax: +34 985103125

**ABSTRACT**

This work describes the synthesis, characterization and application of three  $^{81}\text{Br}$ -labeled diastereoisomers of hexabromocyclododecane (HBCD) for the accurate and precise determination of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD in water samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry. The synthesis of the labeled analogs was carried out by bromination of *cis*, *trans*, *trans*-1,5,9-cyclododecatriene with  $^{81}\text{Br}$ -enriched bromine. After isolation and purification by semipreparative HPLC, each diastereoisomer was characterized in terms of concentration and isotopic enrichment. Then, they were added to the samples to simultaneously quantify the three HBCD diastereoisomers in a single LC-MS/MS injection without resorting to a methodological calibration graph. The results obtained here demonstrate that the use of  $^{81}\text{Br}$ -labeled analogs provides accurate and precise

determinations of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD in real water samples. The limits of quantification obtained in real samples for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD were 0.022, 0.073 and 0.015 ng L<sup>-1</sup>, respectively, significantly lower than those required by the European Directive 2013/39/EC.

#### KEYWORDS

Hexabromocyclododecane diastereoisomers, <sup>81</sup>Br-labeled analogs, Isotope Dilution, Water samples

### 1. INTRODUCTION

Since more than 30 years, 1,2,5,6,9,10-Hexabromocyclododecane (HBCD) has been worldwide employed as flame retardant due to its ability to reduce the flammability of many consumer products<sup>1</sup>. HBCD is used either as additive or reactive component in a variety of polymers, such as polystyrene foams, high-impact polystyrene or epoxy resins.<sup>2</sup> It is produced industrially by the addition of bromine to cis-trans-trans-1,5,9-cyclododecatriene leading to a mixture of three diastereoisomers,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD. Theoretically, 16 different stereoisomers including six pairs of enantiomers as well as 4 meso- forms are possible<sup>3</sup>. Therefore, HBCD is likely to undergo diastereo- and enantio-selective processes in the environment<sup>4</sup>. For example, in sediments  $\gamma$ -HBCD is the most abundant diastereoisomer, but in other matrices, such as biota,  $\alpha$ -HBCD prevails.<sup>5,6</sup>

HBCD has been added to the list of Persistent Organic Pollutants of the Stockholm Convention on November 26<sup>th</sup>, 2014.<sup>7</sup> Also, in 2013 the EU legislation<sup>8</sup> established an annual environmental quality standard of 1.6 ng L<sup>-1</sup> of HBCD (sum of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD) for inland surface water samples. HBCD can be considered a ubiquitous

contaminant. Due to its hydrophobic character, HBCD often accumulate in adipose tissue of biota and it also strongly binds to solid particles such as soil, sediment and sewage sludge<sup>9,10</sup>. Knowledge on the toxicodynamics of HBCD in plants and animals is still rather limited and it is currently difficult to differentiate which diastereoisomer has the highest toxic potential.<sup>11</sup>

The instrumental analysis of HBCD mainly relies on mass spectrometric detection coupled to Liquid or Gas Chromatography<sup>12</sup>. The analysis by Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) operated in the electron-capture negative-ion mode is very sensitive but is limited to the total HBCD determination as isomer interconversion may occur at temperatures higher than 160°C.<sup>13</sup> For this reason, reversed-phase Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) is the preferred choice both using electrospray ionization source (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) as it allows not only diastereoisomer-specific detection but also, when using chiral chromatographic columns it is possible to obtain enantiomer-specific information<sup>14</sup>. It is worth stressing that although high temperatures can be achieved in ESI or APCI sources any isomer interconversion would occur after the chromatographic separation and hence, the identification or quantitation of the analytes are not affected. The use of Solid Phase Extraction for water samples preconcentration<sup>15</sup>, the coupling of convergence chromatography<sup>16</sup> to tandem MS, the use of two coupled reverse phase columns<sup>17</sup> and tandem MS and the use of ultra high performance liquid chromatography coupled to high resolution MS instrumentation<sup>18</sup> are some of the recent methodological advancements of HBCD determinations.

Co-eluting matrix constituents can greatly influence HBCD quantitative measurements by LC-MS/MS due to a suppression or enhancement of the analyte response. The use of isotope-labeled standards is the most efficient approach to overcome or minimize matrix

effects during quantitative analytical LC-MS measurements.<sup>19</sup> Multiply deuterated<sup>20</sup> or <sup>13</sup>C-labeled<sup>21, 22</sup> HBCD diastereoisomers have been used as internal standards to perform IDMS quantifications based on a time-consuming construction of a methodological calibration graph in which different mixtures of the analyte and its labeled analogue must be prepared and analyzed with the isotope diluted samples. When using deuterated compounds isotope effects are likely to occur due to the high relative mass difference between <sup>2</sup>H and <sup>1</sup>H leading to a different behavior between natural abundance and labelled analogs during either sample preparation and/or chromatographic separation.

Besides C, H, O and N, many organic compounds are constituted by other elements (heteroatoms) that may contain a low natural abundance isotope which can be used for isotope labeling. Concerning halogenated compounds <sup>81</sup>Br-labeled analogs have been employed for the determination of polybrominated diphenyl ethers<sup>23</sup> and more recently, <sup>37</sup>Cl-labeled analogs have been employed for the determination of PCBs in solid samples.<sup>24</sup> We present in this work the synthesis, purification, characterization and application of <sup>81</sup>Br-labeled  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD diastereoisomers to the determination of ultratrace levels of HBCD diastereoisomers in water samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS). LC(ESI)-MS/MS is employed to develop a rapid methodology able to quantify all isotope diluted congeners in a single injection without the construction of a methodological calibration graph. The analytical figures of merit of the method meet the requirements of the European Water Framework Directive for HBCD.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Reagents and Materials

<sup>81</sup>Br-enriched sodium bromide was obtained from Trace Sciences International Corp. (Ontario, Canada). Oxone (potassium peroxymonosulfate), ethyl acetate and *cis*, *trans*, *trans*-1,5,9-cyclododecatriene were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Individual certified standards of HBCD diastereoisomers  $\alpha$ -HBCD (purity 99.5%) and  $\gamma$ -HBCD (99.3%) were purchased from Sigma-Aldrich. 100  $\mu\text{g g}^{-1}$  working standard solutions of each diastereoisomer were prepared in toluene and stored in the dark at 4°C until use. A 100.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  solution of  $\beta$ -HBCD in toluene was obtained from Accustandard (New Haven, CT, USA). Toluene was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Hexane was obtained from Sigma-Aldrich. Methanol and acetonitrile used for HPLC were purchased from Fisher Scientific (Loughborough, UK). Ammonium acetate was obtained from Sigma-Aldrich ( $\geq 99.0\%$ ). Ultra-pure water (18.2 M $\Omega\cdot\text{cm}$ ) was obtained from a Milli-Q system (Millipore Co., Bedford, USA). A volume of 5 liters of river water were collected in January 2015 from the River Color (Asturias, NW Spain) at 1.5 km from the village La Piñera (Piloña, Asturias).

### 2.2. Instrumentation

The purification of the in-house synthesised <sup>81</sup>Br-labeled hexabromocyclododecane diastereoisomers was carried out using a HPLC system (Agilent 1260 Infinity, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with an automatic injector with a 100  $\mu\text{L}$  loop, a ZORBAX Eclipse XDB-C18 semi-preparative column (250 mm x 9.4 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), an analytical-scale fraction collector and a variable wavelength UV-VIS spectrophotometer. An analytical balance model AB204-S (Mettler Toledo, Zurich, Switzerland) was used for the gravimetric preparation of all solutions. A mini-vap evaporator/concentrator (Supelco, St. Louis, MO, USA) was used for the evaporation of the samples. The triple quadrupole LC-MS/MS system employed in this work was an Agilent 6460 (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) equipped with a “jet-

stream” electrospray ionization (ESI) source and coupled to a 1290 HPLC infinity system (Agilent Technologies). The chromatographic separation of the  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD was carried out using a Zorbax Eclipse Plus C18 (50 mm x 2.1 mm i.d.; 1.8  $\mu$ m particle size) column (Agilent Technologies, USA). Instrumental control and data acquisition were carried out with the MassHunter software (version B.03.01) supplied by the manufacturer (Agilent Technologies).

### **2.3. Procedures**

#### *2.3.1. Synthesis of the $^{81}\text{Br}$ -labeled HBCD diastereoisomers*

It is important to remark that it is out of the scope of this paper to present any improvement in the synthesis procedure of HBCD diastereoisomers in comparison with previously published procedures<sup>25</sup>. The synthesis of HBCD involved two steps. In the first step sodium bromide was converted to bromine. For this purpose, in a 5 mL glass vial a 2.8 M aqueous solution of oxone® (potassium peroxydisulfate) prepared by dissolving 592 mg of oxone in 1.7 mL of ultrapure water was added to a 1.9 M aqueous solution of sodium bromide prepared by dissolving 50 mg of sodium bromide in 250  $\mu$ L of water. Then 2 mL of ethyl acetate were added and the mixture was sonicated for 30 minutes. Then, the organic layer containing the bromine was separated from the aqueous phase. In the second step, 3.3  $\mu$ L a 0.06 M solution of *cis*, *trans*, *trans*-1,5,9-cyclododecatriene in a 1:1 mixture of ethanol and dichloromethane was cooled to  $-78^\circ\text{C}$  in a nitrogen/acetone bath and vigorously stirred. Then 2 mL of the previously prepared bromine solution in ethyl acetate were added. The reaction mixture was stirred overnight, allowed to warm from  $-78^\circ\text{C}$  to room temperature and the solvent was

evaporated in vacuum at 40°C, to give a crude cream-colored solid. The yield of the synthesis procedure was over 80%.

#### *2.3.2. Purification of the <sup>81</sup>Br-labeled HBCD diastereoisomers by semi-preparative Liquid Chromatography*

The crude solid was dissolved in methanol before starting the isolation and purification of the three diastereoisomers by semi-preparative HPLC. For this purpose, a ZORBAX Eclipse XDB-C18 column was equilibrated by pumping mobile phase at a rate of 1 mL min<sup>-1</sup> for at least 30 minutes. Then, a volume of 100 µL of the dissolved synthesis crude was injected using a flow rate of 2.0 mL min<sup>-1</sup>. Methanol/water (95%/5%) was used as mobile phase under isocratic elution conditions at 30°C. The collection time windows for α-, β- and γ-HBCD were from 6.38 to 6.67 min, from 7.56 to 7.79 min and from 8.17 to 8.58 min, respectively. The collected fractions were evaporated to dryness, dissolved in toluene and stored at -18°C. In this way, individual <sup>81</sup>Br-labeled HBCD diastereoisomers solutions were available for their IDMS application.

#### *2.3.3. Sample preparation procedure for water samples*

A gravimetrically controlled amount of <sup>81</sup>Br-labeled HBCD diastereoisomers was added to 500 mL of water sample. For this purpose, approximately 100 mL of sample were added into a glass volumetric flask. Then, the flask was placed on an analytical balance and a weighed amount of each <sup>81</sup>Br-labeled HBCD diastereoisomer was added to the sample. Typically, 0.2 g of a 1 ng g<sup>-1</sup> solution of each labelled diastereoisomer was

added to 500 mL of sample. The flask was filled with sample to 500 mL, capped with a glass stopper and the isotope diluted sample was manually shaken for one minute to achieve the complete mixing of the natural abundance and labelled compounds. A liquid-liquid extraction of the HBCD diastereoisomers was carried out adding 2 mL of hexane and shaking the flask manually during 10 minutes. Then, most of the organic phase was collected with a Pasteur pipette, transferred to a 2 mL chromatographic vial and preconcentrated to dryness using a gentle stream of nitrogen. The sample was finally reconstituted with 25  $\mu$ L mobile phase and 20  $\mu$ L were injected into the LC-MS/MS system. Please note that the volume of organic phase before and after the preconcentration step as well as the injection volume do not affect the final result. One of the benefits of IDMS is that, after isotope equilibration is achieved between natural abundance and labelled analogue, any loss of substance will affect in the same way the analyte and the labelled compound. Therefore, we only need to preserve during the analytical procedure an aliquot of the sample that provides enough sensitivity in the mass spectrometer to accurately measure the corresponding isotopic intensities of the analyte and its labelled analogue.

#### *2.3.4. Measurement of the samples by LC-MS/MS*

The chromatographic separation of the HBCD diastereoisomers was performed in isocratic mode at a flow rate of 0.4 mL min<sup>-1</sup> and with the column thermostated at 40°C. The isocratic program was 25% of solvent A (Ultra-pure water with 10 mM of ammonium acetate) and 75% of solvent B (80:20 mixture of methanol:acetonitrile). The total run time was 7.5 minutes and the injection volume was 20  $\mu$ L. The ESI source operated in negative mode applying a capillary voltage of 4000V, a drying gas flow rate of 6 mL min<sup>-1</sup>, a drying gas temperature of 300°C, a nebulizer pressure of 45 psi, a

sheath gas flow of 11 mL min<sup>-1</sup> and a sheath gas temperature of 400°C. Selected reaction monitoring (SRM) mode at unit resolution in both quadrupoles was employed for the determination of the HBCD diastereoisomers applying a dwell time of 200 ms, a fragmentor voltage of 60 V and a collision energy of 14V. The SRM transitions measured for the IDMS quantification of the three HBCD diastereoisomers were 638.6→78.9 and 646.6→80.9.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1. Determination of HBCD diastereoisomers by IDMS and LC-MS/MS**

An important aim of this work was the development of a SRM measurement procedure allowing the direct quantification the three HBCD diastereoisomers in a single LC-MS/MS injection without resorting to an IDMS calibration graph. As the three diastereoisomers have the same isotopic composition, their complete chromatographic separation is required. Details on the optimization of the chromatographic separation are given in the Supplementary Material. The main conclusions of these experiments can be summarize as follows: i) ammonium acetate was added to the mobile phase to decrease the formation of chlorine adducts of the molecular ion ii) the use of a mixture of methanol and acetonitrile as organic solvent in the mobile phase provided the best chromatographic separation between the three HBCD diastereoisomers iii) samples were reconstituted in 25 µL of mobile phase and an injection volume of 20 µL was selected to achieve the lowest limit of detection. Figure 1 shows a LC-MS/MS chromatogram of a fortified Ultra-pure water sample containing the three natural abundance diastereoisomers at 0.6 ng L<sup>-1</sup> measured using the SRM mode (638.6→78.9). As can be observed, the chromatographic conditions employed in this work provide a baseline resolution of the three diastereoisomers in less than 6 minutes. The average retention time and its associated standard deviation obtained from the injection of n=8

independent ultrapure water samples was  $3.737 \pm 0.063$ ,  $4.450 \pm 0.073$  and  $5.387 \pm 0.087$  for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD diastereoisomers, respectively. When injecting  $n=3$  independent river water samples, the average retention time and its associated standard deviation was  $3.677 \pm 0.007$ ,  $4.367 \pm 0.004$  and  $5.281 \pm 0.004$  min for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD diastereoisomers, respectively.

Figure 2 shows the theoretical mass spectra corresponding to the  $[M-H]^-$  cluster for a natural abundance and a  $^{81}\text{Br}$ -labeled diastereoisomer. When measuring the samples in SIM mode we selected the  $m/z$  638.6; 640.6; 642.6; 644.6; 646.6 and 647.6 to calculate the concentration of the analytes by multiple linear regression as reported elsewhere.<sup>26</sup> When analyzing the samples by SRM a similar strategy than that presented in a previous publication for PCBs quantification was followed.<sup>24</sup> For this purpose, we must select two precursor ions (one for the natural abundance compound and another for the labeled analogue) corresponding to a single isotopologue and express the intensities of the two SRM transitions of the sample as a linear combination of the theoretical abundances of the natural abundance and labeled isotopologue as described in equation [1].

$$\begin{bmatrix} I_{exp}^{79} \\ I_{exp}^{81} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat,corr}^{79} & A_{lab}^{79} \\ A_{nat}^{81} & A_{lab}^{81} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat}^{79} \\ X_{lab}^{81} \end{bmatrix} \quad [1]$$

Equation [1] provides this way the molar fractions of natural abundance and labeled HBCD ( $X_{nat}$  and  $X_{lab}$ , respectively). As the number of moles of the labeled HBCD added at the beginning of the sample preparation is known, the number of moles of the

natural abundance HBCD can be obtained from the ratio of molar fractions as described in equation [2].

$$\frac{X_{nat}}{X_{lab}} = \frac{n_{nat}}{n_{lab}} \quad [2]$$

Preliminary experiments carried out with  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD standards showed that the most favored reaction occurring during collision induced dissociation (CID) was the loss of bromine atoms, and that the most intense fragment ions corresponded to the bromine ions at masses 78.9 and 80.9. In this way, for the  $^{81}\text{Br}$ -labeled analogs the isotopologue  $^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_{17}^{81}\text{Br}_6$  at  $m/z$  646.6 was selected as precursor ion in the SRM transition  $646.6 \rightarrow 80.9$  because it is the most abundant for the labeled analogue (Figure 2) and the contribution at this  $m/z$  of other isotopologues is negligible. It is worth noting that although the natural abundance compound contributes also to this  $m/z$  such spectral overlap is corrected in equation [1]. In the case of the natural abundance compound, three isotopologues at  $m/z$  636.6, 638.6 and 640.6 (Figure 2) were evaluated as potential precursor ions for a SRM transition in which the product ion is measured at  $m/z$  78.9. These isotopologues contain a different proportion of  $^{79}\text{Br}$  and  $^{81}\text{Br}$  atoms. Therefore, to obtain accurate results in equation [1], the theoretical abundance of the isotopologue  $A_{nat,corr}^{79}$  must be corrected taking into account the ratio of  $^{79}\text{Br}$  and  $^{81}\text{Br}$ . In this way the abundance for the isotopologue  $^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_{17}^{79}\text{Br}_5^{81}\text{Br}_1$  at  $m/z$  636.6 is 8.75%, but it was multiplied by 5/6 before applying equation [1]. Similarly, the abundance for  $^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_{17}^{79}\text{Br}_4^{81}\text{Br}_2$  at  $m/z$  638.6 was multiplied by 4/6 and that for  $^{12}\text{C}_{12}^1\text{H}_{17}^{79}\text{Br}_3^{81}\text{Br}_3$  at  $m/z$  640.6 was multiplied by 3/6.

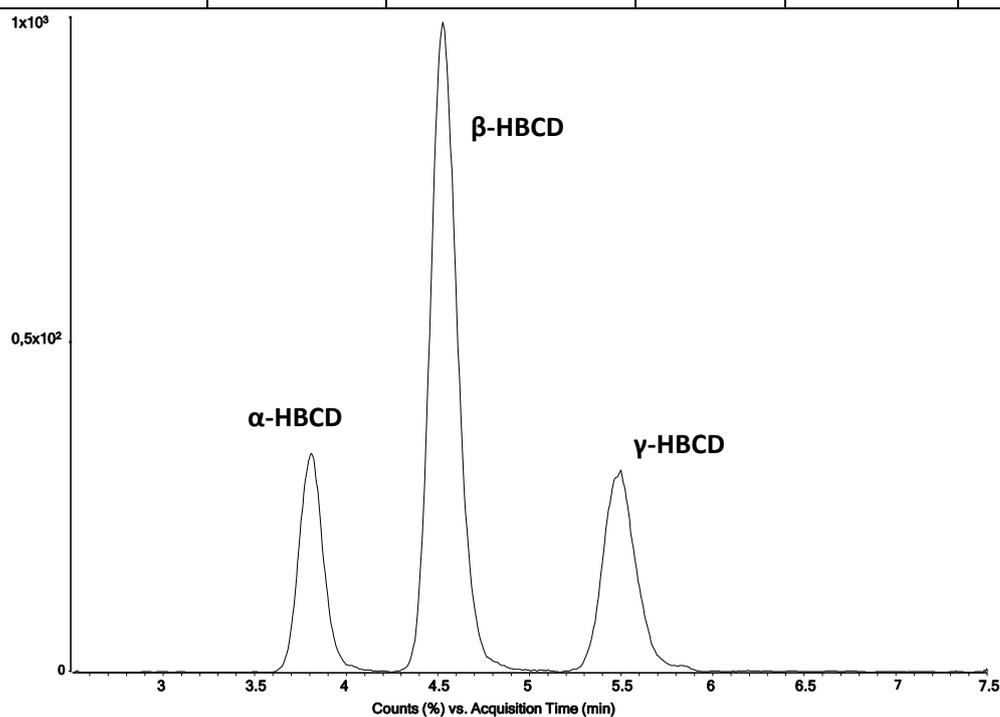
### 1.1. Characterization of $^{81}\text{Br}$ -Labeled HBCD diastereoisomers.

. Then, the isotopic enrichment of the  $^{81}\text{Br}$ -labeled HBCD diastereoisomers was calculated following the procedure described elsewhere<sup>27</sup>. For this purpose the LC(ESI)-MS/MS instrument was operated in negative mode (ESI) and twelve  $m/z$  values (from 636.6 to 647.6) of the  $[\text{M-H}]^-$  cluster were monitored in SIM mode for each diastereoisomer. The enrichment obtained for all diastereoisomers is given in Table 1 and as can be observed, we did not find a significant difference in the enrichment between the three diastereoisomers taking into account the standard deviation of the values. The enrichment of the three diastereoisomers was approximately of 99.3% as shown in Table 1.

The concentration of the  $^{81}\text{Br}$ -labeled HBCD diastereoisomers in the mixture was determined by reverse IDMS using natural abundance certified standards. Three independent mixtures of natural and labeled analogue for each diastereoisomer were prepared and injected in triplicate in the LC-MS/MS system. For validation purposes, the mixtures were analyzed both in SIM and in SRM mode in the same LC-MS/MS system. As commented in the previous section, three different transitions were evaluated to measure the natural abundance compound (636.6 $\rightarrow$ 78.9, 638.6 $\rightarrow$ 78.9 and 640.6 $\rightarrow$ 78.9). The concentrations for the three  $^{81}\text{Br}$ -labeled HBCD diastereoisomers obtained under the different acquisition procedures applied are also given in Table 1. First, we can observe that the results obtained measuring the three different transitions are in agreement at the 95% confidence interval ( $k=2$ ). The transition 638.6 $\rightarrow$ 78.9 was selected in equation [1] for the following experiments due to a more favorable error propagation than transition 640.6 $\rightarrow$ 78.9 and similar sensitivity. Also this transition provided  $^{81}\text{Br}$ -labeled diastereoisomers concentration in agreement with the concentrations obtained by SIM. The relative standard deviation obtained by the proposed LC-MS/MS measurement procedure was always lower than 4%.

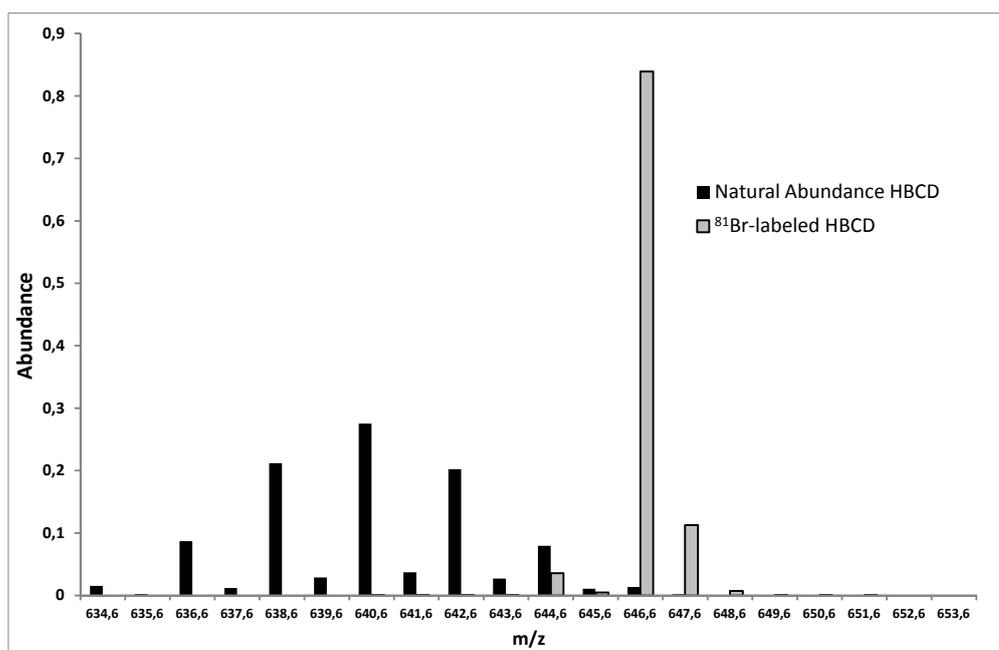
**Table 1.** Isotopic enrichment and concentration of the  $^{81}\text{Br}$ -enriched HBCD diastereoisomers. The isotopic enrichment was calculated following the procedure described elsewhere(27). The concentration of the  $^{81}\text{Br}$ -enriched HBCD diastereoisomers was calculated by reverse IDMS using a LC-MS/MS instrument operating in SIM mode and in SRM mode using three different transitions for the natural abundance compound. Uncertainty is expressed as 2s standard deviation of  $n = 3$  independent replicates (95% confidence interval).

HBCD Diastereoisomer	Isotopic Enrichment (%)	Concentration by reverse IDMS ( $\text{ng g}^{-1}$ )			
		SIM $m/z$ from 636.6 to 647.6	SRM 636.6 $\rightarrow$ 78.9 646.6 $\rightarrow$ 80.9	SRM 638.6 $\rightarrow$ 78.9 646.6 $\rightarrow$ 80.9	SRM 640.6 $\rightarrow$ 78.9 646.6 $\rightarrow$ 80.9
$\alpha$ -HBCD	$99.35 \pm 0.05$	$1147 \pm 24$	$1195 \pm 46$	$1155 \pm 40$	$1185 \pm 22$
$\beta$ -HBCD	$99.30 \pm 0.01$	$1286 \pm 12$	$1355 \pm 34$	$1315 \pm 38$	$1368 \pm 38$
$\gamma$ -HBCD	$99.35 \pm 0.05$	$1341 \pm 12$	$1356 \pm 58$	$1393 \pm 56$	$1376 \pm 34$



**Figure 1.**

LC(ESI)-MS/MS chromatograms of a ultrapure water sample fortified with the three natural abundance HBCD diastereoisomers ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) at a concentration level of  $0.6 \text{ ng L}^{-1}$  measured by SRM mode using the transition  $638.6 \rightarrow 78.9$ .



**Figure 2.** Theoretical mass spectra for the  $[M-H]^-$  natural abundance HBCD diastereoisomer and a  $^{81}\text{Br}$ -labeled diastereoisomer.

### 3.3. Accuracy and limit of quantification of the method in ultrapure water

Due to the hydrophobic nature of HBCD diastereoisomers, their levels in water are very low. Indeed, the European Directive 2013/39/EC<sup>7</sup> lays down an annual average environmental quality standard (AA-EQS) for HBCD of  $1.6 \text{ ng L}^{-1}$  for the sum of the three diastereoisomers in inland surface waters and the European Directive 2009/90/EC requires that the minimum performance criteria for all methods of analysis applied are based on an uncertainty of measurement of 50 % or below ( $k=2$ ) estimated at the level of relevant EQS and a limit of quantification equal or below a value of 30 % of the relevant EQS. According to these regulations we have considered in this work an EQS of  $0.6 \text{ ng L}^{-1}$  for each compound and hence, a limit of quantification of  $0.18 \text{ ng L}^{-1}$  for each of the HBCD diastereoisomers.

Assuming that a complete mixing between the analytes and the labeled analogs was achieved at the beginning of the sample preparation, there is no need to calculate the

final preconcentration factor applied to the sample. Using this sample preparation strategy, we evaluated first the limit of quantification achievable in Ultra-pure water, by analysing 8 blanks by IDMS in two different measurement days. For this purpose approximately 0.2 g of 1 ng g<sup>-1</sup> solutions of each <sup>81</sup>Br-enriched HBCD diastereoisomer were added to 500 mL of ultra-pure water. The results obtained are given in Table 2 and as can be observed, the LOQ values obtained for the three diastereoisomers ranged from 0.011 to 0.062 ng L<sup>-1</sup> which is significantly lower than the required LOQ value of 0.18 ng L<sup>-1</sup>.

The accuracy of the proposed method was evaluated analyzing ultra-pure water fortified with natural abundance  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD at approximately 0.5 ng L<sup>-1</sup>. For this purpose, 0.2 g of a 1 ng g<sup>-1</sup> solution of each labelled and natural abundance HBCD diastereoisomer was added. Again, 8 independent replicates were analyzed on two different measurement days. The results obtained are given in Table 3 where we can observe that the obtained recoveries ranged from 95% to 106% for  $\alpha$ -HBCD, from 102 to 120% for  $\beta$ -HBCD and from 103% to 112% for  $\gamma$ -HBCD. The relative standard deviation (RSD%) of the recovery values ranged from 1 to 5%.

**Table 2.** Blank values (in ng L<sup>-1</sup>) and resulting Limits of Quantification (LOQs) calculated in two different measurement days as 10 times the standard deviation of n=4 independent replicates of 500 mL of Ultra-pure water.

	<b>Blank Values Day 1 (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Blank Values Day 2 (ng L<sup>-1</sup>)</b>
<b><math>\alpha</math>-HBCD</b>	0.079	0.010
	0.073	0.002
	0.067	0.002
	0.081	0.005
	<b>Average</b>	<b>0.075</b>
<b>Standard deviation</b>	<b>0.006</b>	<b>0.004</b>

(SD)		
LOQ (10SD)	<b>0.062</b>	<b>0.038</b>
<b><math>\beta</math>-HBCD</b>	<b>Blank Values Day 1 (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Blank Values Day 2 (ng L<sup>-1</sup>)</b>
	0.018	0.003
	0.016	0.002
	0.015	0.002
	0.019	0.003
<b>Average</b>	<b>0.017</b>	<b>0.003</b>
<b>Standard deviation (SD)</b>	<b>0.002</b>	<b>0.001</b>
LOQ (10SD)	<b>0.017</b>	<b>0.011</b>
<b><math>\gamma</math>-HBCD</b>	<b>Blank Values Day 1 (ng L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Blank Values Day 2 (ng L<sup>-1</sup>)</b>
	0.043	0.008
	0.041	0.007
	0.031	0.004
	0.042	0.014
<b>Average</b>	<b>0.039</b>	<b>0.008</b>
<b>Standard deviation (SD)</b>	<b>0.005</b>	<b>0.004</b>
LOQ (10SD)	<b>0.053</b>	<b>0.042</b>

**Table 3.** Results obtained in the analysis of Ultra-pure water fortified at approximately 0.4-0.5 ng L<sup>-1</sup> using the proposed methodology. Uncertainty of the average recovery values corresponds to the 1s standard deviation of n=4 independent extractions.

HBCD Isomers	Days	Theoretical concentration (ng L <sup>-1</sup> )	Experimental concentration (ng L <sup>-1</sup> )	Recovery (%)	Average recovery (%)
<b><math>\alpha</math>-HBCD</b>	Day 1	0.386	0.400	104	101 ± 5
		0.391	0.392	100	
		0.390	0.371	95	

		0.380	0.403	106	
	Day 2	0.410	0.424	103	103 ± 1
		0.411	0.424	103	
		0.415	0.420	101	
		0.412	0.425	103	
<b>β-HBCD</b>	Day 1	0.481	0.552	115	117 ± 3
		0.478	0.576	120	
		0.478	0.565	118	
		0.490	0.558	114	
	Day 2	0.470	0.479	102	104 ± 2
		0.467	0.490	105	
		0.469	0.501	107	
		0.468	0.483	103	
<b>γ-HBCD</b>	Day 1	0.470	0.494	105	104 ± 1
		0.474	0.492	104	
		0.475	0.489	103	
		0.458	0.473	103	
	Day 2	0.465	0.479	106	108 ± 3
		0.473	0.490	105	
		0.461	0.501	110	
		0.463	0.483	112	

### 3.4. Accuracy and limit of quantification of the method in river water samples

A previous analysis of a river water sample collected from the River Color (Asturias, NW Spain) revealed that the concentration of HBCD diastereoisomers was below the detection limit of the method. Therefore, this water sample was employed not only to evaluate the accuracy of the method but also to calculate the limit of quantification in real samples. For the calculation of the LOQ approximately 0.2 g of a 1 ng g<sup>-1</sup> solution

of each  $^{81}\text{Br}$ -enriched HBCD diastereoisomer were added to 500 mL of river water sample. The results obtained are given in in Table 4 and as can be observed, the LOQ values obtained for the three diastereoisomers ranged now from 0.015 to 0.073 ng L<sup>-1</sup>. These values are very similar to those obtain in Ultra-pure water and also significantly lower than 0.18 ng L<sup>-1</sup> which is the required LOQ value by the EU legislation. In order to compare the LOQ values obtained in river water with those obtained in ultrapure water we performed a two-tailed Fisher test to check if there was a statistical difference between the standard deviations of both data sets. The test showed that there was no statistical difference between both standard deviations and hence the LOQ values obtained in both matrices at the 95% confidence level. Figure S6 of the Supplementary Material shows the SRM transition 638.6→78.9 corresponding to natural abundance  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD obtained in a LC(ESI)-MS/MS chromatogram of a representative ultrapure water sample analysed for the determination of the blank values.

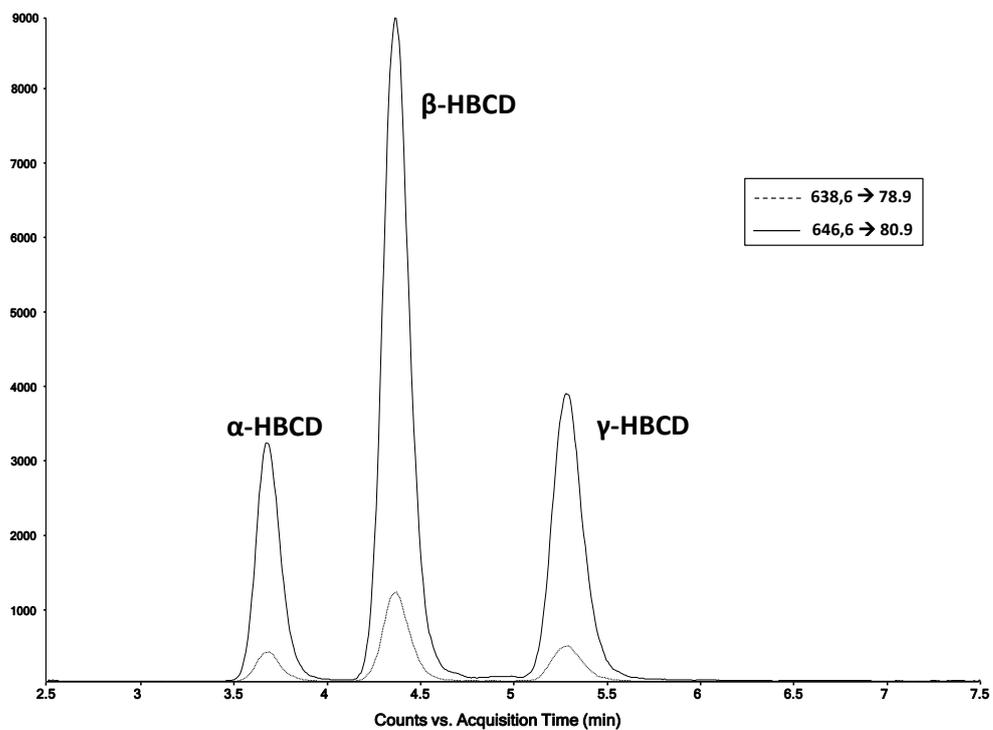
Finally, the accuracy of the proposed method was evaluated analyzing the river water sample fortified with natural abundance  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD at approximate concentration level of 0.5 ng L<sup>-1</sup>. The results obtained are given in Table 5 and, as can be observed, the obtained recoveries from n=3 independent replicates ranged from 100% to 103% for  $\alpha$ -HBCD, from 92% to 95% for  $\beta$ -HBCD and from 105% to 115% for  $\gamma$ -HBCD. The relative standard deviation (RSD%) of the recovery values ranged from 2 to 4.6%. Figure 3 shows a LC-MS/MS chromatogram of one of the fortified river water samples where it is possible to observe the sensitivity obtained by the method. The absence of spectral interferences facilitates the proper integration of the chromatographic peak profiles of the HBCD diastereoisomers.

**Table 4.** Blank values (in ng L<sup>-1</sup>) and resulting Limits of Quantification (LOQs) calculated as 10 times the standard deviation of n=3 independent replicates of 500 mL of a river water sample.

<b><math>\alpha</math>-HBCD</b>	<b>Blank Values (ng L<sup>-1</sup>)</b>
	0.0064
	0.0058
	0.0023
<b>Average</b>	<b>0.0048</b>
<b>Standard deviation (SD)</b>	<b>0.0022</b>
<b>LOQ (10SD)</b>	<b>0.022</b>
<b><math>\beta</math>-HBCD</b>	<b>Blank Values (ng L<sup>-1</sup>)</b>
	0.0312
	0.0251
	0.0168
<b>Average</b>	<b>0.0244</b>
<b>Standard deviation (SD)</b>	<b>0.0073</b>
<b>LOQ (10SD)</b>	<b>0.073</b>
<b><math>\gamma</math>-HBCD</b>	<b>Blank Values (ng L<sup>-1</sup>)</b>
	0.0078
	0.0080
	0.0053
<b>Average</b>	<b>0.0071</b>
<b>Standard deviation (SD)</b>	<b>0.0015</b>
<b>LOQ (10SD)</b>	<b>0.015</b>

**Table 5.** Results obtained in the analysis of river water fortified at approximately 0.5 ng L<sup>-1</sup> using the proposed methodology. Uncertainty of the average recovery values corresponds to the 1s standard deviation of n=3 independent extractions.

HBCD Isomers	Theoretical concentration (ng L <sup>-1</sup> )	Experimental concentration (ng L <sup>-1</sup> )	Recovery (%)	Average recovery (%)
$\alpha$ -HBCD	0.425	0.437	103	102 ± 2
	0.421	0.421	100	
	0.423	0.435	103	
$\beta$ -HBCD	0.576	0.542	94	94 ± 2
	0.566	0.520	92	
	0.572	0.546	95	
$\gamma$ -HBCD	0.476	0.516	108	109 ± 5
	0.474	0.496	105	
	0.476	0.547	115	



**Figure 3.** LC(ESI)-MS/MS chromatogram of a river water sample fortified at approximately  $0.5 \text{ ng L}^{-1}$  of natural abundance (SRM transition  $638.6 \rightarrow 78.9$ ) and  $^{81}\text{Br}$ -labeled (SRM transition  $646.6 \rightarrow 80.9$ ) HBCD diastereoisomers.

#### 4. CONCLUSIONS

We have synthesized and characterized three HBCD diastereoisomers ( $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ ) labeled in  $^{81}\text{Br}$  to develop a SI traceable procedure for the accurate and precise quantification of  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -HBCD in water samples. The results obtained in this work demonstrate that the quantification strategy based on the use of  $^{81}\text{Br}$ -labeled analogs, and equations [1] and [2] provides accurate and precise determinations of the three HBCD diastereoisomers in real water samples without resorting to a methodological calibration graph. Although the same multiple linear regression approach could be employed using multiply  $^{13}\text{C}$ -labelled or multiply deuterated analogs, isotope effects are more likely to occur, particularly using multiply deuterated standards. The proposed method allows a faster determination of the analytes and a lower consumption of expensive labeled material in comparison with regular IDMS approaches. The LOQ values of  $0.022$ ,  $0.073$  and  $0.015 \text{ ng L}^{-1}$  achieved in real samples by the proposed methodology for  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -HBCD, respectively are significantly lower than those required by the European Directive 2013/39/EC (calculated as  $0.18 \text{ ng L}^{-1}$  for each diastereoisomer).

#### ACKNOWLEDGMENTS

Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through Project CTQ2012-36711 (cofounded by FEDER) is acknowledged. Financial support from FICYT (Asturias)

through project IE09-421 in the framework "Ayudas a empresas para la ejecución de proyectos de I+D+i" financed jointly by the FEDER operative program is also acknowledged. The UE is acknowledged for the provision of FEDER funds for the purchase of the LC-MS/MS instrument. P. Rodríguez-González acknowledges his research contract RYC-2010-06644 to the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the Ramón y Cajal Program.

#### REFERENCES

- [1] C. A. De Wit, An overview of brominated flame retardants in the environment, *Chemosphere*. 46 (2002) 583-624.
- [2] L. S. Birnbaum, D. F. Staskal, Brominated flame retardants: cause for concern?, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 9-17.
- [3] N. V. Heeb, W. B. Schweizer, P. Mattrel, R. Haag, A. C. Gerecke, M. Kohler, P. Schmid, M. Zennegg, M. Wolfensberger, Solid-state conformations and absolute configurations of (+) and (-)  $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -hexabromocyclododecane (HBCDs), *Chemosphere*. 68 (2007) 940-950.
- [4] R. J. Law, M. Kohler, N. V. Heeb, A. C. Gerecke, P. Schmid, S. Voorspoels, A. Covaci, G. Becher, K. Janák, C. Thomsen, Hexabromocyclododecane challenges scientists and regulators, *Environ. Sci. Tech.* 39 (2005) 281A-287A.
- [5] R. J. Law, C. R. Allchin, J. De Boer, A. Covaci, D. Herzke, P. Lepom, S. Morris, J. Tronczynski, C. A. de Wit, Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment, *Chemosphere*. 64 (2006) 187-208.
- [6] K. Law, T. Halldorson, R. Danell, G. Stern, S. Gewurtz, M. Alae, C. Marvin, M. Whittle, G. Tomy, Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a lake Winnipeg (Canada) food web, *Environ. Toxicol. Chem.*, 25 (2006) 2177-2186.
- [7] The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, <http://chm.pops.int/Implementation/NewPOPs/TheNewPOPs/tabid/672/Default.aspx>, accessed July 27th, 2015.
- [8] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12<sup>th</sup> August 2013.

- [9] S. Morris, P. Bersuder, C. R. Allchin, B. Zegers, J. P. Boon, P. E. G. Leonards, J. De Boer, Determination of the brominated flame retardant, hexabromocyclododecane, in sediments and biota by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 343-349.
- [10] R. J. Law, A. Covaci, S. Harrad, D. Herzke, M. A.-E. Abdallah, K. Fernie, L.-M. L. Toms, H. Takigami, Levels and trends of PBDEs and HBCD in the global environment: status at the end of 2012, *Environ. Int.* 65 (2014) 147–158.
- [11] C. Koch, T. Schmidt-Kötters, R. Rupp, B. Sures, Review of hexabromocyclododecane (HBCD) with a focus on legislation and publications concerning toxicokinetics and dynamics, *Environ. Pollut.* 199 (2015) 26-34.
- [12] A. C. Dirtu, M. Abdallah, A. Covaci, Advances in the sample preparation of brominated flame retardants and other brominated compounds, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 189-203.
- [13] R. Köppen, R. Becker, C. Jung, I. Nehls, On the thermally induced isomerisation of hexabromocyclododecane stereoisomers, *Chemosphere.* 71 (2008) 656–662.
- [14] P. Guerra, E. Eljarrat, D. Barceló, Determination of halogenated flame retardants by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 842-855.
- [15] S. Suzuki, A. Hasegawa, Determination of Hexabromocyclododecane Diastereoisomers and Tetrabromobisphenol A in Water and Sediment by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry, *Analytical Sciences* 22 (2006) 469-474.
- [16] L. Mullin, J.A. Burgess, I. E. Jogsten, D. Geng, A. Aubin, B. van Bavel, Rapid separation of hexabromocyclododecane diastereomers using a novel method combining convergence chromatography and tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 7 (2015) 2950-2958.
- [17] Q. Han, H. Song, S. Gao, X. Zeng, Z. Yu, Y. Yu, G. Sheng, J. Fu, Determination of ten hexabromocyclododecane diastereoisomers using two coupled reversed-phase columns and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 1473–1478.
- [18] D. Zacs, J. Rjabova, I. Pugajeva, I. Nakurte, A. Viksna, V. Bartkevics, Ultra high performance liquid chromatography–time-of-flight high resolution mass spectrometry in

the analysis of hexabromocyclododecane diastereomers: Method development and comparative evaluation versus ultra high performance liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry and triple quadrupole tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1366 (2014) 73-83.

[19] A. González-Antuña, J. C. Domínguez-Romero, J. F. García-Reyes, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J. I. García Alonso, A. Molina-Díaz, Overcoming matrix effects in electrospray: quantitation of  $\beta$ -agonists in complex matrices by isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry using  $^{13}\text{C}$ -labeled analogs, *J. Chromatogr. A*. 1288 (2013) 40– 47.

[20] M.S. Ross, C.S. Wong, Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure photoionization, and anion attachment atmospheric pressure photoionization for the analysis of hexabromocyclododecane enantiomers in environmental samples, *J. Chromatogr. A*. 1217 (2010) 7855-7863.

[21] N. G. Dodder, A. M. Peck, J. R. Kucklick, L. C. Sander, Analysis of hexabromocyclododecane diastereomers and enantiomers by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: chromatographic selectivity and ionization matrix effects, *J. Chromatogr. A*. 1135 (2006) 36-42.

[22] K. Vorkamp, K. Bester, F. F. Rigét, Species-specific time trends and enantiomer fractions of hexabromocyclododecane (HBCD) in biota from East Greenland, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 10549-10555.

[23] A. González-Gago, J.M. Marchante-Gayon, M. Ferrero, J.I. García Alonso, Determination of ultra-trace levels of priority PBDEs in water samples by isotope dilution GC(ECNI)MS using  $^{81}\text{Br}$ -labelled standards, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3024–3032.

[24] L. Somoano-Blanco, P. Rodríguez-González, S. García Alonso, J. I. García Alonso, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7840-7847.

[25] K. Smith, C.H. Liu, G.A. El-Hiti, G.S. Kang, E. Jones, S.G. Clement, A.D. Checquer, O.W. Howarth, M.B. Hurtshouse, S.J. Coles, An extensive study of bromination of cis,trans,trans-1,5,9-cyclododecatriene: product structures and conformations. *Org. Biomol. Chem.* 3 (2005) 1880-1892.

[26] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J. I. Garcia Alonso, Evaluation of minimal  $^{13}\text{C}$ -labelling for stable isotope dilution in organic analysis, *Analyst*. 135 (2010) 953–964.

[27] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 49 (2014) 681–691.

**SUPPLEMENTARY MATERIAL**

**SIMULTANEOUS DETERMINATION OF  $\alpha$ -,  $\beta$ - AND  $\gamma$ -  
HEXABROMOCYCLODODECANE DIASTEREOMERS IN WATER  
SAMPLES BY ISOTOPE DILUTION MASS SPECTROMETRY USING  $^{81}\text{Br}$ -  
LABELED ANALOGUES**

Lourdes Somoano-Blanco<sup>a</sup>, Pablo Rodríguez-González<sup>a\*</sup>, Giuseppe Centineo<sup>b</sup>, Sergio García Fonseca<sup>b</sup> and J. Ignacio Garcia Alonso<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>*Department of Physical and Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain.*

<sup>b</sup> *ISC-Science, Innovative Solutions in Chemistry, S.L. Edificio Científico-Tecnológico Campus de "El Cristo" 33006, Oviedo, Spain.*

\*Author for correspondence: [rodriguezpablo@uniovi.es](mailto:rodriguezpablo@uniovi.es)

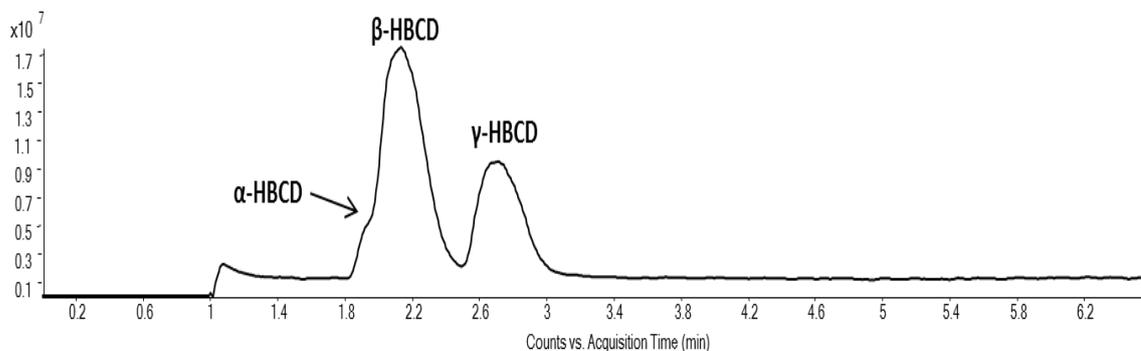
**Number of pages: 6**

**Number of Figures: 6**

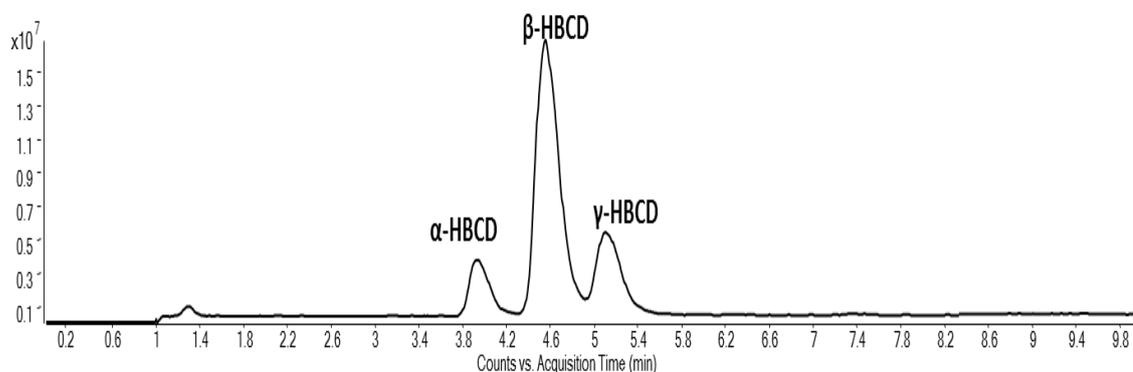
**Optimization of chromatographic conditions for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD diastereoisomers separation.**

Previous publications <sup>1, 2</sup> reported the chromatographic separation of HBCD diastereoisomers using a mixture of water and acetonitrile or methanol in isocratic mode. Based on those publications, the first experiment was the comparison of a separation carried out using a mixture of 20% ultrapure water and 80% acetonitrile at a flow rate of 0.25 mL min<sup>-1</sup> with another separation using a mixture of 20% ultrapure water and 80% MeOH, at the same flow rate. In both cases ammonium acetate was used as additive to improve the sensitivity by inhibiting the formation of chlorine adducts of the molecular ion<sup>3,4</sup>. Figure S1 shows the LC-MS chromatogram of a 20  $\mu\text{g g}^{-1}$  standard mixture of  $\alpha$ -,

$\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD measured in Scan mode when using acetonitrile and Figure S2 the separation obtained when using methanol as organic solvent in the mobile phase.



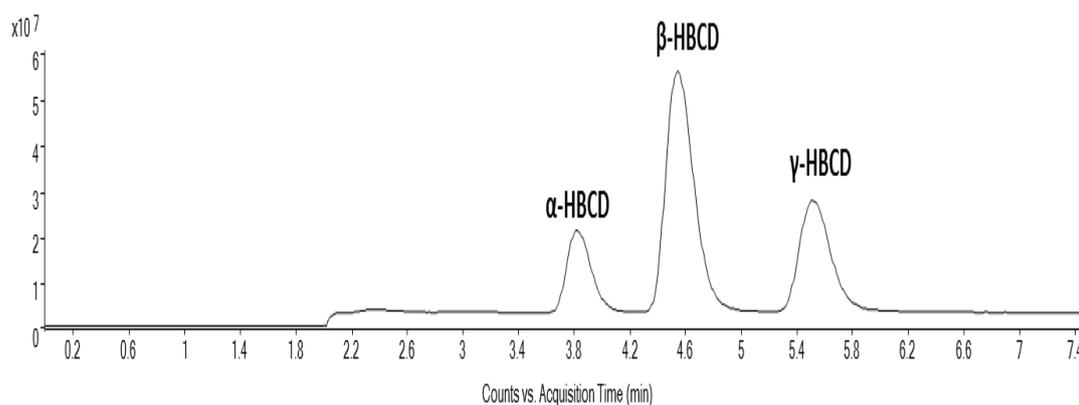
**Figure S1.** LC-MS chromatogram of a  $20 \mu\text{g g}^{-1}$  mixture of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD diastereoisomers in isocratic mode using a mixture of 20% ultrapure water and 80% acetonitrile at a flow rate of  $0.25 \text{ mL min}^{-1}$ .



**Figure S2.** LC-MS chromatogram of a  $20 \mu\text{g g}^{-1}$  mixture of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD diastereoisomers in isocratic mode using a mixture of 20% ultrapure water and 80% methanol at a flow rate of  $0.25 \text{ mL min}^{-1}$ .

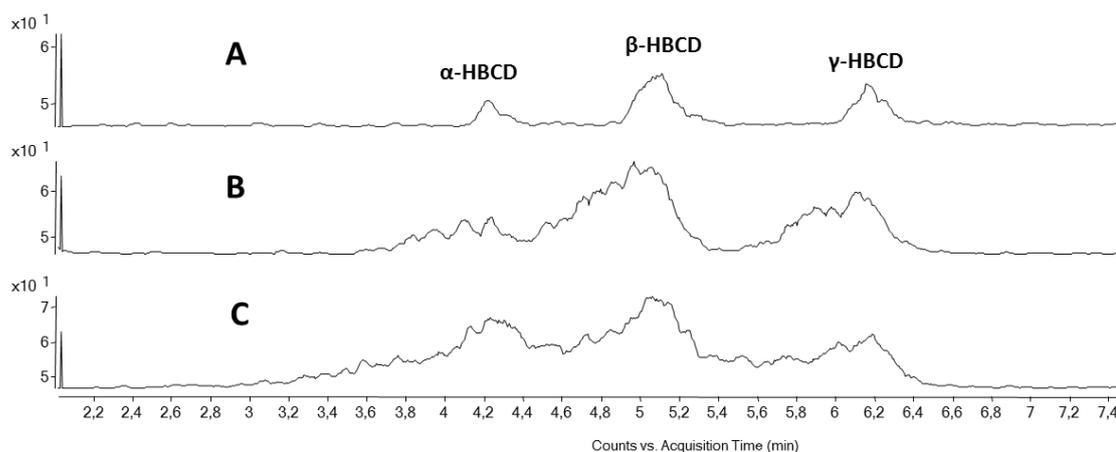
As can be observed, when using acetonitrile  $\alpha$ - and  $\beta$ - diastereoisomers coelute whereas when using methanol instead of acetonitrile baseline separation between both diastereoisomers is achieved. However, baseline separation between  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD diastereoisomers is not achieved in any case. In order to improve the separation between all diastereoisomers a binary mobile phase was used as previously reported<sup>5</sup>. For this purpose, a separation was carried out in isocratic mode using 25% of solvent A

(ultrapure water with 10 mM of  $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) and 75% of solvent B (80% MeOH and 20% acetonitrile). In addition the flow rate was increased to  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$  to decrease the retention times. Figure S3 shows the LC-MS chromatogram of a  $20 \mu\text{g g}^{-1}$  standard mixture of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD measured in Scan mode using the binary mobile phase. As can be observed, baseline resolution of the three diastereoisomers was achieved in less than seven minutes.



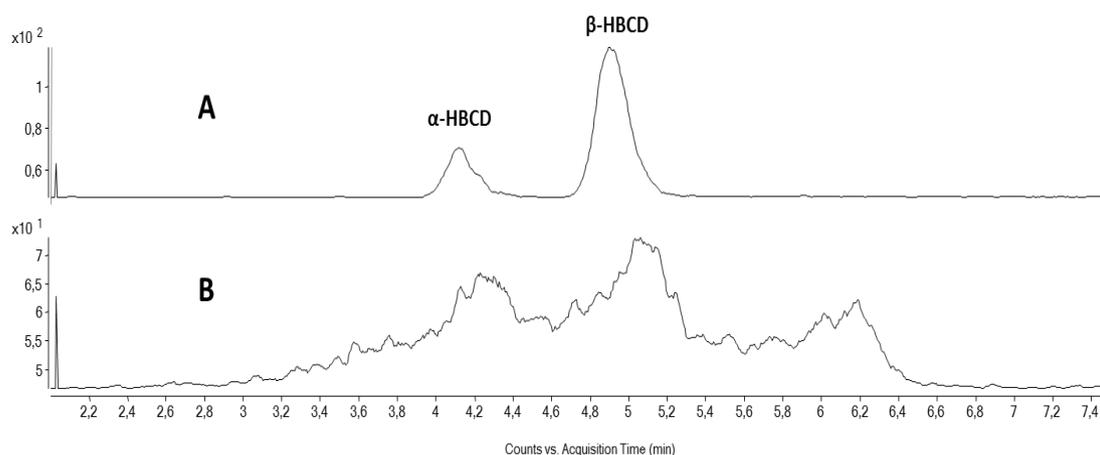
**Figure S3.** LC-MS chromatogram of a  $20 \mu\text{g g}^{-1}$  mixture of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD diastereoisomers in isocratic mode using a mobile phase of 25% of mobile phase A (ultrapure water with 10 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) and 75% of mobile phase B (80% MeOH and 20% acetonitrile) at a flow rate of  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$ .

These optimized chromatographic conditions were employed for the analysis of water samples. However, the quantification of HBCD diastereoisomers at the sub  $\text{ng L}^{-1}$  range requires the application of preconcentration techniques. In this work we applied a liquid-liquid extraction step adding 2 mL of hexane to a sample volume of 500 mL. After 10 minutes of manual shaking, most of the organic phase was transferred to a chromatographic vial, preconcentrated under a stream on nitrogen to dryness and reconstituted in  $25 \mu\text{L}$ . According to this preconcentration strategy, the solvent employed for the reconstitution and the injection volume was optimized. First, acetonitrile was employed for reconstitution and three different injection volumes were tested (2, 10 and  $20 \mu\text{L}$ ). Figure S4 shows the LC-MS/MS chromatograms obtained in SRM mode for the three injection volumes assayed in a preconcentrated sample reconstituted in acetonitrile. A significant distortion of the chromatographic peak shape was observed particularly when injecting 10 and  $20 \mu\text{L}$ .



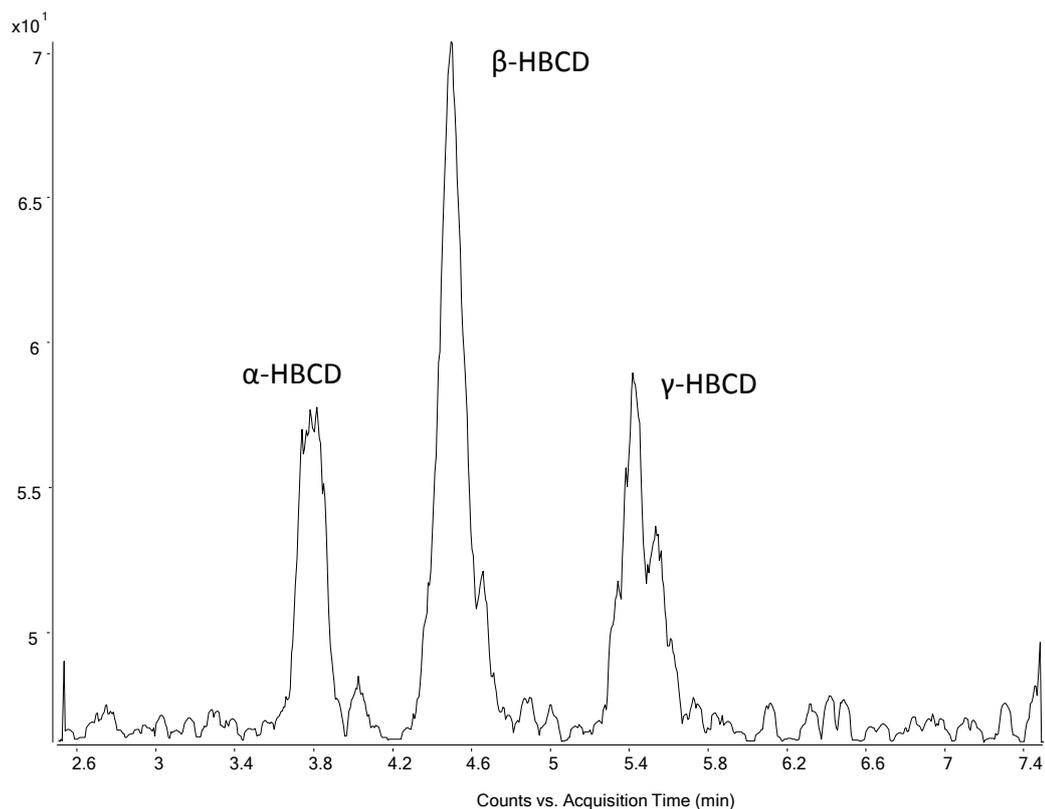
**Figure S4.** LC-MS/MS chromatogram obtained using the previously optimized conditions injecting A) 2  $\mu$ L B) 10  $\mu$ L and C) 20  $\mu$ L of a pre-concentrated sample containing 0.05  $\text{ng L}^{-1}$  reconstituted in acetonitrile containing  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -HBCD diastereoisomers.

According to these results we tried the reconstitution of the sample in the binary mobile phase (25% ultrapure water with 10 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$  and 75% of a 80:20 mixture of MeOH and acetonitrile). Figure S5 shows the comparison of the chromatographic peak shape of  $\alpha$ - and  $\beta$ - HBCD diastereoisomers obtained when injecting 20  $\mu$ L of sample reconstituted in the mobile phase and 20  $\mu$ L of sample reconstituted in acetonitrile. As can be observed, the reconstitution with mobile phase provided a satisfactory peak shape.



**Figure S5.** LC-MSMS chromatogram obtained using the previously optimized conditions injecting 20  $\mu\text{L}$  of a preconcentrated sample containing 0.05  $\text{ng L}^{-1}$  of  $\alpha$ - and  $\beta$ - HBCD diastereoisomers reconstituted in A) mobile phase and B) acetonitrile.

### Analysis of the blanks



**Figure S6.** SRM transition 638.6 $\rightarrow$ 78.9 corresponding to the natural abundance compounds of an LC(ESI)-MS/MS chromatogram of a representative ultrapure water sample measured for the determination of the blank value.

### REFERENCES

<sup>1</sup> Z. Yu, P. Peng, G. Sheng, J. Fu, Determination of hexabromocyclododecane diastereoisomers in air and soil by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1190 (2008) 74-79.

<sup>2</sup> H. Wu, H. Chen, W. Ding, Combining microwave-assisted extraction and liquid chromatography-ion-trap mass spectrometry for the analysis of

hexabromocyclododecane diastereoisomers in marine sediments, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 7755-7760.

<sup>3</sup> Plácido Galindo-Iranzoa, Jesús Eduardo Quintanilla-López, Rosa Lebrón-Aguilar, Belén Gómarac, Improving the sensitivity of liquid chromatography–tandem mass spectrometry, analysis of hexabromocyclododecanes by chlorine adduct generation *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 3919–3926

<sup>4</sup> C. Tang. Quantitative determination of the diastereoisomers of hexabromocyclododecane in human plasma using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 878 (2010) 3317-3322.

<sup>5</sup> N. A. Al-Odaini, U. H. Yim, N. S. Kim, W. J. Shim, S. H. Hong, Isotopic dilution determination of emerging flame retardants in marine sediments by HPLC-APCI-MS/MS, *Anal. Methods.* 5 (2013) 1771-1778.

## **5. Discusión integradora**

---

---

---



### 5. DISCUSIÓN INTEGRADORA

El desarrollo de la metodología IDMS a lo largo de la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo utilizando análogos enriquecidos isotópicamente en el heteroátomo en lugar de análogos enriquecidos en  $^{13}\text{C}$  o  $^2\text{H}$  como suele ser habitual en el desarrollo de otras metodologías de cuantificación de compuestos orgánicos mediante IDMS. La utilización de estos análogos enriquecidos como  $^{37}\text{Cl}$ -PCBs y  $^{81}\text{Br}$ -HBCD, presenta una serie de ventajas con respecto a otros tipos de marcaje isotópico. En primer lugar, la diferencia de masa relativa entre los compuestos de abundancia isotópica natural y sus análogos enriquecidos es menor, por lo que se minimizan los posibles efectos isotópicos. En segundo lugar, el marcaje en el heteroátomo de un compuesto orgánico permite utilizar, aparte de las fuentes de ionización moleculares como EI, ESI o APCI, otras fuentes de ionización como la fuente ICP o la NCI, ampliando de esta forma el campo de aplicación de la metodología.

Las metodologías de cuantificación desarrolladas se han validado con la utilización de materiales de referencia certificados, evaluando los resultados obtenidos en términos de exactitud y precisión. Además de obtener buenos resultados desde un punto de vista metrológico, se ha pretendido a lo largo de la presente Tesis Doctoral que las metodologías desarrolladas proporcionen mejoras en pasos tan importantes como la extracción o disminuir tiempo de análisis total con el mínimo coste en material de vidrio y disolvente de extracción. Esto se ha conseguido con el uso de microondas focalizadas para extraer los contaminantes halogenados de matrices sólidas de distinta naturaleza utilizando mínimas cantidades de muestra (0.1-0.2 g) y de disolvente de extracción (4mL) y tiempos de extracción muy cortos (4-8 min). Además, el tiempo de análisis total también se ha reducido aplicando metodologías de regresión lineal múltiple que permiten obtener la concentración del analito en la muestra sin necesidad de construir un calibrado metodológico.

La Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas ha sido la técnica escogida para la determinación de los congéneres prioritarios de PCBs en muestras sólidas. Una de las fuentes de ionización que se ha utilizado ha sido la fuente de ionización electrónica (EI). Como se ha comentado en la introducción, y también en la sección del experimental es necesario, en un primer momento, conocer el comportamiento de estos compuestos en la fuente de ionización. Existen algunos

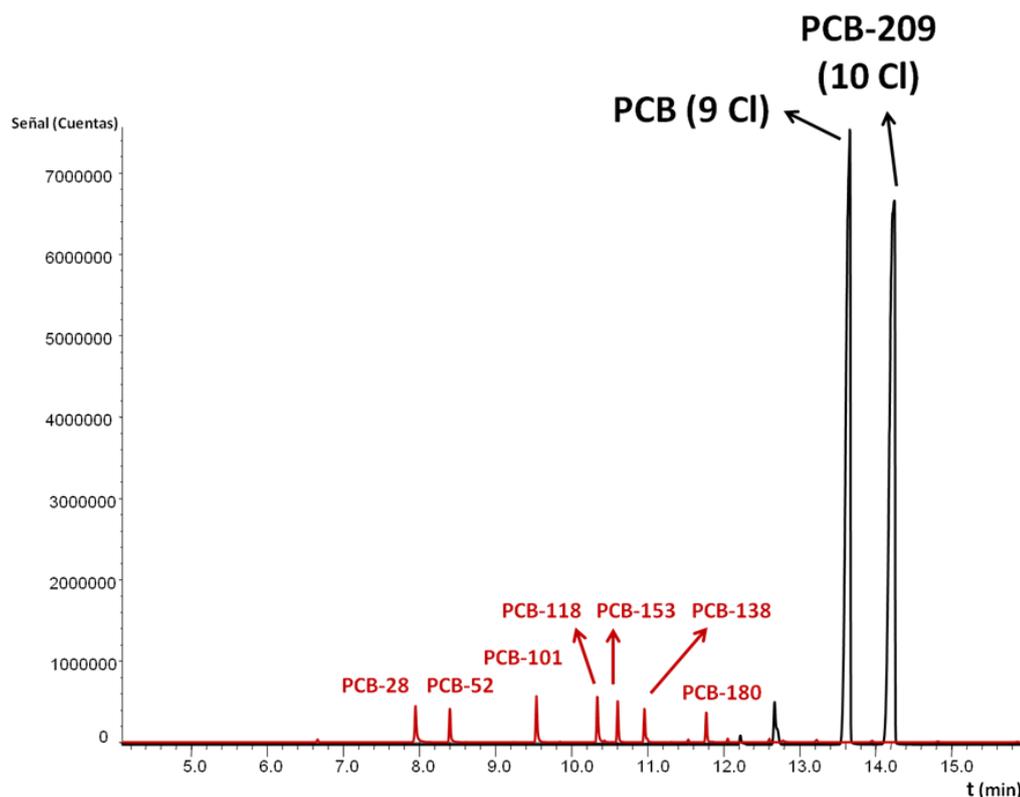
compuestos que tienen tendencia a perder hidrógeno en la fuente EI. Por tanto es necesario estudiar la contribución del ión molecular ( $M^+$ ) y de la especie M-1, según se ha descrito en el apartado 3.3.1 de la sección experimental para una correcta medida de la distribución isotópica del analito. Además, otro factor incluso más importante que el anterior y que explica la posible contribución a M-1 es una insuficiente resolución de masas observada en analizadores de tipo cuadrupolo<sup>1</sup>.

Con todo ello, y tras realizar el estudio del patrón de fragmentación para los PCBs se observó que prácticamente existe un 100% de contribución  $M^+$ , con apenas influencia del M-1 lo que demuestra por una parte, que no existe la pérdida de H en la fuente, y por otra parte que no se aprecian efectos debidos a una insuficiente resolución espectral, probablemente debido a que las medidas han sido realizadas en equipos de última generación.

El punto de partida para el desarrollo de las metodologías IDMS en la determinación de los analitos investigados a lo largo de esta Tesis Doctoral ha sido la síntesis de los compuestos enriquecidos isotópicamente. Concretamente se ha llevado a cabo la **síntesis de 12 PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$**  como se presenta en el artículo científico 1. Para ello partiendo de  $\text{Na}^{37}\text{Cl}$  (compuesto comercial de elevado coste) se obtuvo cloro en fase gas enriquecido en el isótopo  $^{37}\text{Cl}$ . El elevado coste del reactivo de partida, junto con la dificultad de trabajar con una sustancia en fase gas dificultó significativamente la optimización del procedimiento de síntesis. Por ello, todos los experimentos previos a la síntesis definitiva se realizaron con NaCl de abundancia isotópica natural.

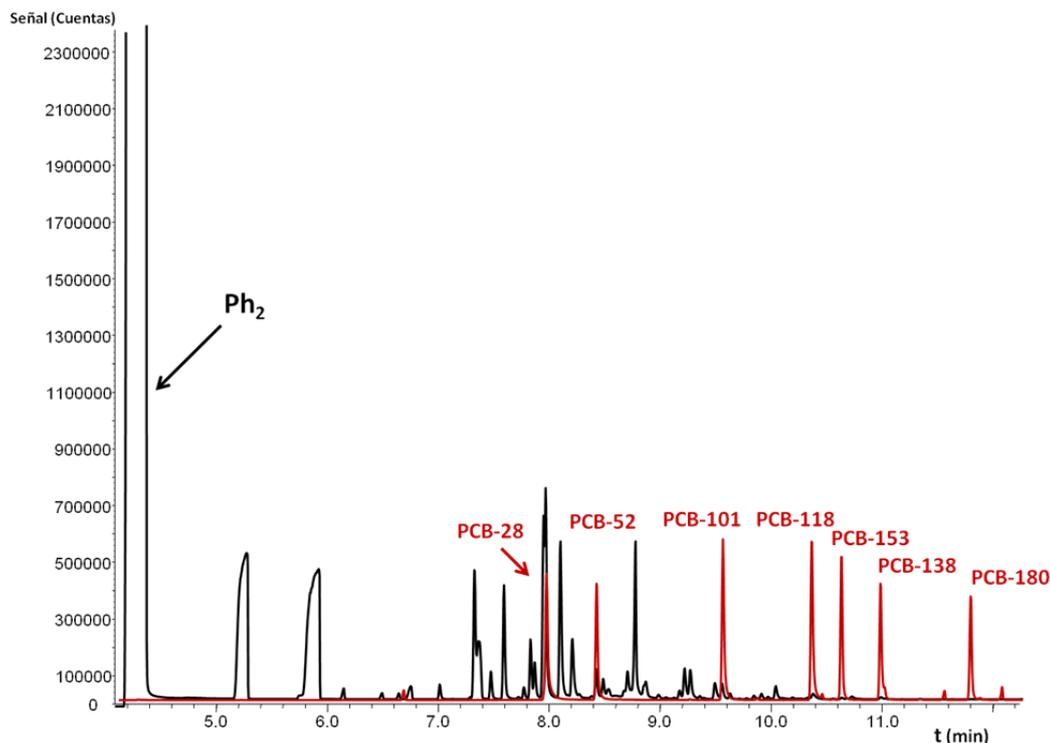
Para minimizar los problemas derivados de trabajar con  $^{37}\text{Cl}_{2(\text{g})}$  se diseñó un sistema de vidrio específico con el que llevar a cabo la reacción de oxidación. Además se optó por utilizar un baño de acetona y  $\text{N}_{2(\text{liq})}$  a aproximadamente  $-70^\circ\text{C}$  para “retener” el  $^{37}\text{Cl}_{2(\text{g})}$  generado y evitar pérdidas del producto enriquecido. Una vez obtenido el  $^{37}\text{Cl}_{2(\text{g})}$  se llevó a cabo una segunda reacción consistente en la adición electrófila del Cl a los anillos aromáticos del bifenilo. La cantidad de bifenilo añadida se tuvo que optimizar cuidadosamente ya que en las pruebas de síntesis precedentes se observó que la cantidad de bifenilo determinaba el grado de cloración final de los PCBs sintetizados. Los 12 congéneres de interés presentan distintos grados de cloración que van desde 3 hasta 8 átomos de Cl. En estos experimentos previos se observó que no era posible obtener la mezcla de los 12 congéneres en una única reacción. En la Figura 5.1 se superpone el

cromatograma de un patrón de los 7 congéneres prioritarios con el cromatograma obtenido en una reacción de síntesis donde se utilizó una cantidad de 3,7 mg de bifenilo. Como se puede observar en esta reacción de síntesis se obtuvo el máximo grado de cloración con la formación del PCB-209 (10 átomos de Cl en la molécula) y de otro PCB con 9 átomos de Cl.



**Figura 5.1** Superposición del cromatograma GC-MS correspondiente a una síntesis de PCBs en la que se utilizó una cantidad de 3,7 mg de bifenilo (color negro) con el cromatograma GC-MS de un patrón que contiene los 7 congéneres de PCBs prioritarios (color rojo).

Por el contrario, aumentando la cantidad de bifenilo hasta los 40 mg se disminuye considerablemente el grado de cloración del bifenilo, como se observa en la Figura 5.2. En esta figura se observa, además de un gran pico debido al exceso de bifenilo ( $\text{Ph}_2$ ) varios picos anteriores al primero de los PCBs prioritarios correspondientes a congéneres con una bajo grado de cloración (1 o 2 átomos de Cl en la molécula).



*Figura 5.2 Superposición del cromatograma GC-MS correspondiente a una síntesis de PCBs en la que se utilizó una cantidad de 40 mg de bifenilo (color negro) con el cromatograma GC-MS de un patrón que contiene los 7 congéneres de PCBs prioritarios.*

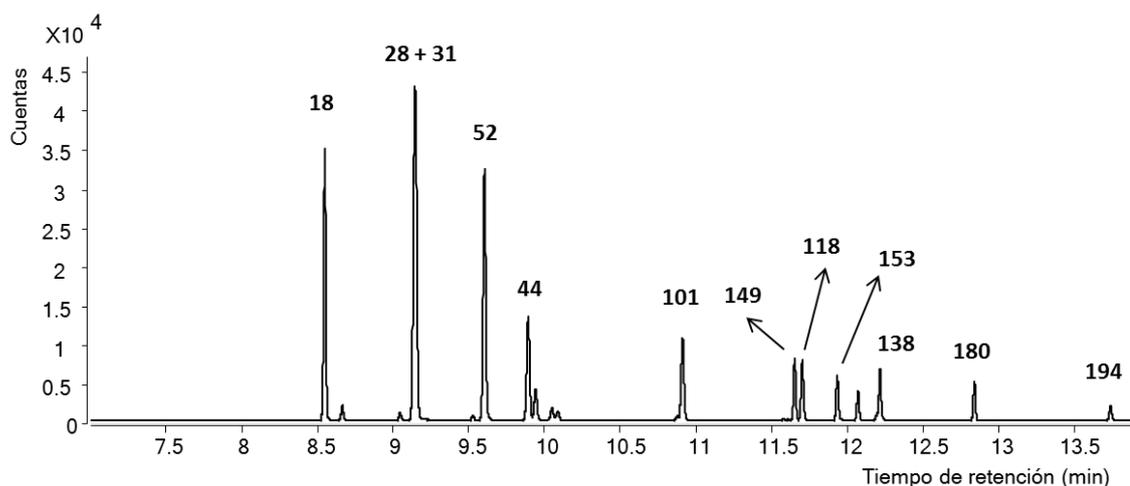
En base a estas observaciones, se optimizó la cantidad de bifenilo añadida para dirigir la reacción hacia un mayor o menor grado de cloración. Se observó que con aproximadamente **5,5 mg de bifenilo** se obtenían los PCBs prioritarios que presentan un mayor grado de cloración, como son los PCB-138, 149, 153, 180 y 194 (hexa-, hepta- y octaclorados). Análogamente, añadiendo aproximadamente **12,5 mg de bifenilo** se obtuvieron los PCBs prioritarios con menor grado de cloración PCB-18, 28, 31, 44, 52, 101, 118 (tri-, tetra- y pentaclorados).

Como puede observarse en la Figura S1 de la información complementaria del [artículo científico 1](#) se obtuvieron dos crudos de reacción, donde no solo se sintetizaron los 12 congéneres de PCBs en estudio, si no que se obtuvieron cantidades significativas de otros muchos congéneres. El siguiente paso fue, por tanto, la **separación y purificación de los crudos de reacción** con el objeto de aislar los doce PCBs prioritarios enriquecidos isotópicamente. Para ello se utilizó un sistema HPLC-UV a escala semipreparativa provisto de un colector de fracciones. Utilizando patrones comerciales

de abundancia isotópica natural se identificaron los tiempos de retención para cada uno de los 12 PCBs en las condiciones cromatográficas optimizadas. Conocidos los tiempos de retención se recogieron las fracciones de interés de forma automatizada, se evaporó la fase móvil de cada una de las fracciones y se redisolvió los PCBs en isoocetano. En la Figura S2 del [artículo científico 1](#), se pueden observar los cromatogramas HPLC-UV correspondientes a los crudos de reacción obtenidos con las cantidades optimizadas de bifenilo.

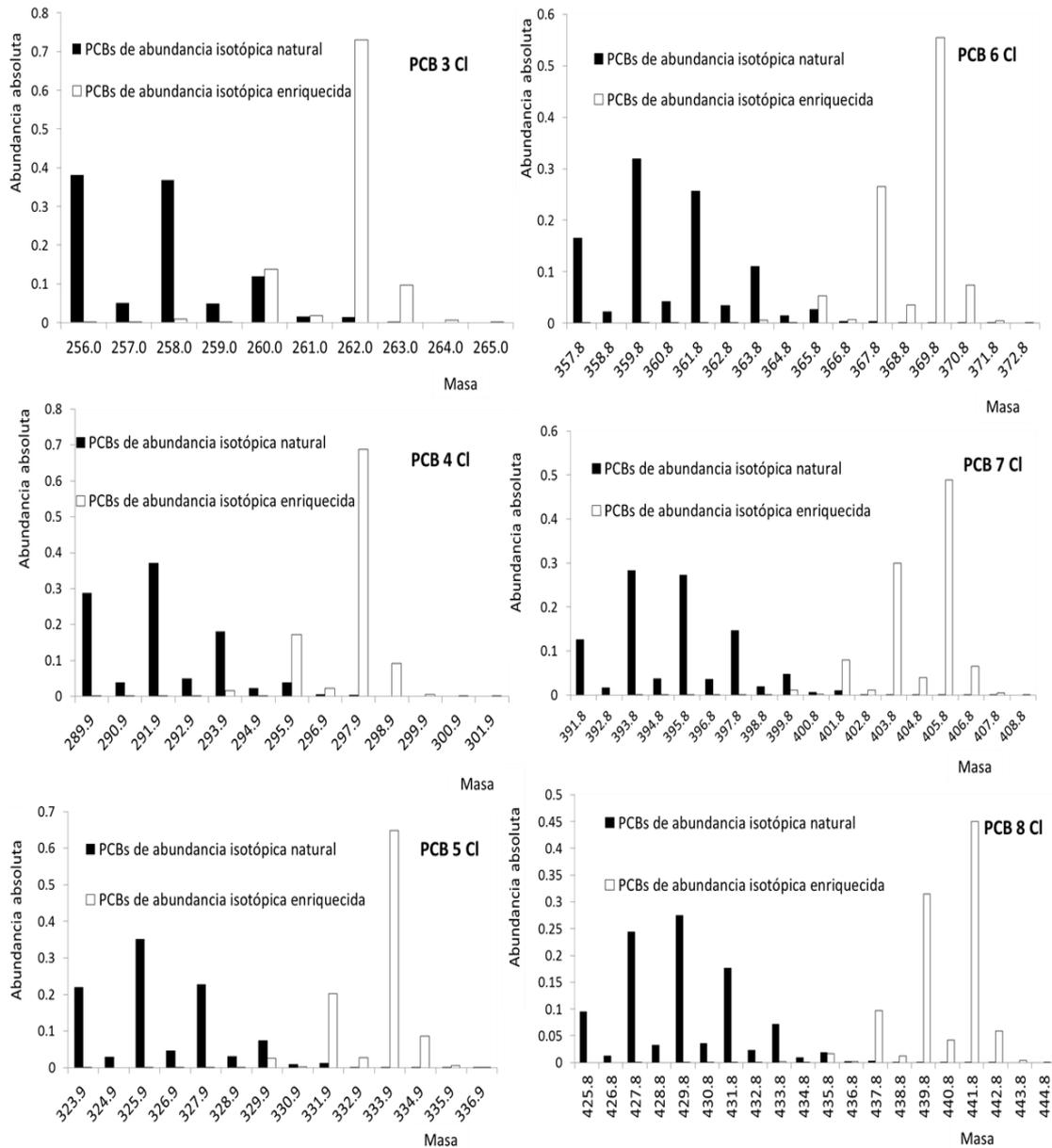
Para la completa identificación de las fracciones recogidas se utilizó también un GC-MS en modo Scan. Los espectros de masas experimentales obtenidos para las especies de abundancia isotópica natural y enriquecida se encuentran en la información complementaria del [artículo científico 1](#) (Figuras S3-S8).

Tras realizar la purificación de cada una de las fracciones obtenidas se obtuvo una disolución individual para cada uno de los congéneres prioritarios enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ . A partir de estas disoluciones se preparó una mezcla en la que los 12 congéneres estuviesen al mismo nivel de concentración constituyendo la mezcla de trabajo que se empleó en todas las determinaciones que se presentan en esta Tesis Doctoral. En la Figura 5.3 se puede observar el cromatograma GC-MS/MS resultante de la mezcla de los 12 congéneres  $^{37}\text{Cl}$ -PCBs en modo SRM a una concentración aproximada de  $100 \text{ ng g}^{-1}$ .



**Figura 5.3** Cromatograma GC-MS/MS de la mezcla de los 12 congéneres enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  en modo SRM a una concentración aproximada de  $100 \text{ ng g}^{-1}$ .

Una vez obtenida la mezcla los congéneres prioritarios enriquecidos isotópicamente, el siguiente paso fue el cálculo del **enriquecimiento isotópico** para cada uno de los congéneres de acuerdo al procedimiento experimental y matemático descrito en la sección 3.3.3 del experimental. Para los PCBs menos clorados (PCB-18, 28, 31, 44, 52, 101 y 118) se obtuvo un enriquecimiento isotópico entre el 93,99% y el 94,16%, mientras que para los PCBs que presentan un mayor grado de cloración (PCB-138, 149, 153, 180 y 194), el enriquecimiento isotópico encontrado varió entre el 91,45% y el 92,70%. La Figura 5.4 muestra los espectros de masas teóricos para los PCBs enriquecidos según el grado de cloración y el enriquecimiento isotópico obtenido. Estos espectros de masas se obtuvieron utilizando el programa de cálculo descrito en la sección 3.3.3 del experimental. La Figura 5.4 también muestra para cada grado de cloración (desde triclorados a octaclorados) el espectro de masas de los PCBs de abundancias isotópicas naturales. Como se puede observar el espectro de masas de los compuestos enriquecidos es sustancialmente diferente a los compuestos naturales.



*Figura 5.4 Espectros de masas teóricos de los PCBs de abundancia isotópica natural y enriquecida en  $^{37}\text{Cl}$  para cada grado de cloración de los PCBs prioritarios, obtenidos a partir del programa de cálculo descrito en la sección 3.3.3 del experimental.*

La **determinación de la concentración** de los PCBs enriquecidos isotópicamente en la disolución mezcla se ha llevado a cabo mediante dilución isotópica inversa utilizando patrones de PCBs de abundancia isotópica natural. La Tabla 5.1 muestra la concentración y la desviación estándar obtenida para cada uno de los PCBs en estudio promediando los resultados obtenidos en siete días distintos a lo largo de un periodo de

seis meses. Como se puede observar, se obtuvo una RSD por debajo del 7%, lo que concuerda con la alta estabilidad química que presentan los PCBs en el medio ambiente.

*Tabla 5.1* Concentración en  $\text{ng g}^{-1}$  para los congéneres de PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  presentes en la disolución empleada a lo largo de la Tesis Doctoral. La incertidumbre de los valores corresponde a la desviación estándar de la concentración obtenida a lo largo de  $n=7$  determinaciones a lo largo de un periodo de 6 meses.

PCBs	Concentración ( $\text{ng g}^{-1}$ )
18	$1147 \pm 25$
28+31	$1927 \pm 25$
44	$947 \pm 35$
52	$1008 \pm 26$
101	$1028 \pm 34$
118	$1015 \pm 32$
138	$1421 \pm 55$
149	$1049 \pm 47$
153	$804 \pm 54$
180	$1079 \pm 53$
194	$1346 \pm 22$

La determinación del enriquecimiento isotópico y de la concentración del trazador isotópico es un requisito fundamental para desarrollar una metodología IDMS que no esté basada en un calibrado metodológico, ya que es necesario conocer el número de moles del trazador añadidos a la muestra para conocer el número de moles de los PCBs presentes en la misma. Una vez llevada a cabo la caracterización del trazador isotópico, se optimizó el proceso de extracción de PCBs desde una matriz sólida, con el uso del microondas focalizadas (según el protocolo descrito en el apartado 3.2.2 de la sección

experimental). La validación de la metodología se llevó a cabo mediante el análisis de los siguientes materiales de referencia certificados:

- ✓ SRM 1944 New York/New Jersey waterway sediment.
- ✓ SRM 1947 Lake Michigan Fish Tissue.
- ✓ CRM 962-50 Loamy soil.

En base a la bibliografía consultada, para el SRM 1944 (sedimento) se utilizaron dos disolventes de extracción, como son tolueno y una mezcla de hexano:acetona (1:1). En todos los casos se emplearon 4 mL de disolvente y se llevó a cabo la extracción a 70°C durante 4 min. Los valores de recuperación respecto al valor certificado y la desviación estándar relativa (RSD) de las concentraciones obtenidas se presentan de forma resumida en la Tabla 5.2.

Finalmente, para el análisis de sedimentos se seleccionó la mezcla hexano:acetona (1:1) como disolvente de extracción, no solo por los valores de recuperación y la precisión obtenidos. Otras razones fueron la mayor rapidez en evaporar los extractos para preconcentrar las muestras y la menor toxicidad de la mezcla hexano:acetona en comparación con el tolueno. Cuando se analizó el material certificado CRM 962 (arena arcillosa) se aplicaron las mismas condiciones de extracción que las utilizadas para el SRM 1944, al tratarse de matrices de una naturaleza similar.

En el análisis del material SRM 1947 (tejido de pescado) también se realizaron pruebas de extracción utilizando tres extractantes distintos: mezcla (1:1) de hexano:acetona, hexano e isooctano. El volumen y la temperatura de extracción fueron los mismos que en el análisis de sedimentos pero el tiempo de extracción se aumentó de 4 a 8 minutos. La Tabla 5.2 muestra los valores de recuperación respecto al valor certificado y la desviación estándar relativa (RSD) de las concentraciones obtenidas.

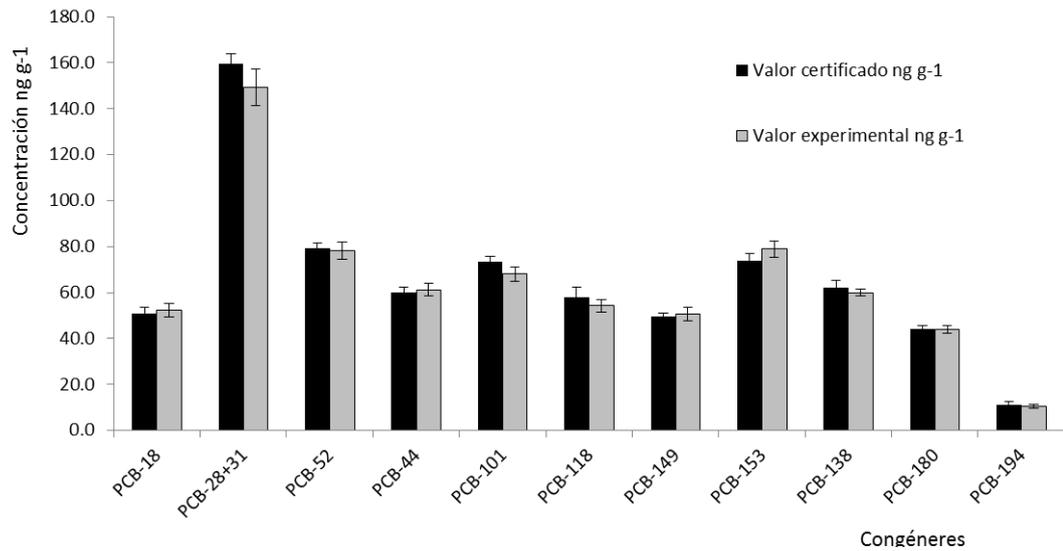
A la vista de los resultados obtenidos la mezcla hexano:acetona se descartó debido a la alta irreproducibilidad obtenida en los valores de concentración. Entre el hexano y el isooctano, los resultados en términos de recuperaciones y reproducibilidad no presentaron demasiadas diferencias. Sin embargo, durante el proceso de extracción con hexano se observaron pérdidas importantes de extractante debido a su mayor

volatilidad. Por este motivo se seleccionó el isooctano, ya que presenta un punto de ebullición más elevado que el del hexano (99°C frente a 68°C).

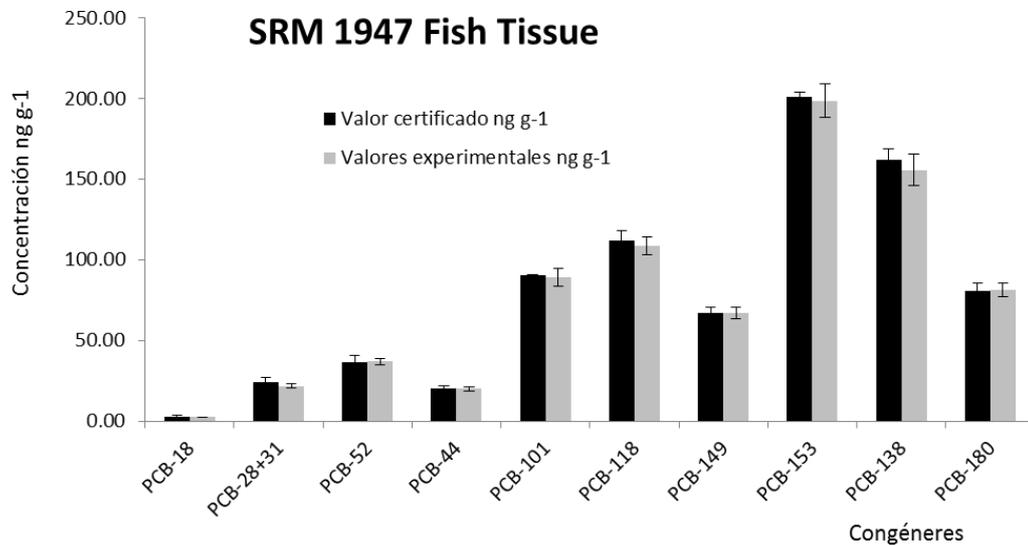
**Tabla 5.2** Rango de recuperaciones y valores de desviación estándar relativa (RSD) de las concentraciones obtenidas en la determinación de los 12 PCBs objeto de estudio durante las pruebas de optimización de la extracción por microondas focalizada utilizando distintos disolventes en los materiales de referencia SRM 1944 (sedimento) y SRM 1947 (tejido de pescado).

<b>Material de referencia</b>	<b>Disolvente de extracción</b>	<b>Recuperaciones (%)</b>	<b>RSD(%)</b>
<b>SRM 1944 (sedimento)</b>	Hexano:Acetona (1:1)	93 - 112	0,5 - 12
	Tolueno	83 - 99	0,5 - 5
<b>SRM 1947 (tejido de pescado)</b>	Hexano:Acetona (1:1)	75 - 135	3 - 43
	Hexano	83 - 102	2 - 9
	Isooctano	82 - 104	2 - 14

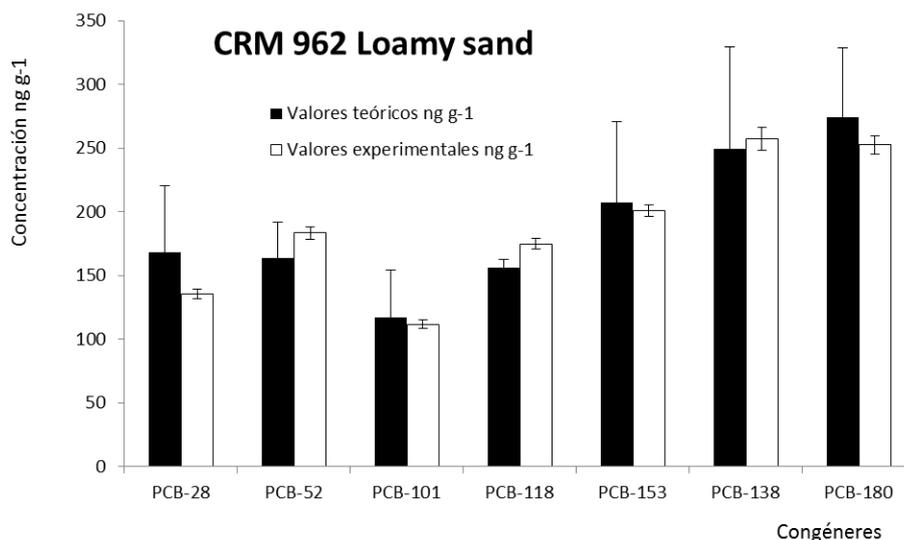
Una vez optimizadas las condiciones de extracción se llevó a cabo la validación de la metodología analizando varios materiales de referencia. Las Figuras 5.5, 5.6 y 5.7 muestran los valores de concentración obtenidos junto con su desviación estándar bajo las condiciones de extracción optimizadas para el material SRM 1944, SRM 1947 y CRM 962, respectivamente.



**Figura 5.5** Diagrama de barras donde se compara la concentración ( $\text{ng g}^{-1}$ ) certificada para cada uno los 12 congéneres de PCBs con la concentración obtenida experimentalmente para el sedimento SRM 1944, utilizando las condiciones de extracción optimizadas.



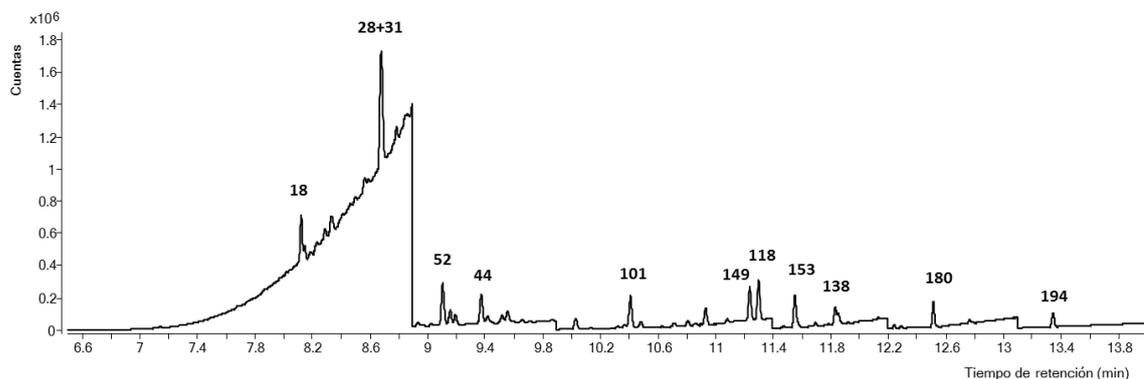
**Figura 5.6** Diagrama de barras donde se compara la concentración ( $\text{ng g}^{-1}$ ) certificada para cada uno los 12 congéneres de PCBs con la concentración obtenida experimentalmente para el tejido de pescado SRM 1947, utilizando las condiciones de extracción optimizadas.



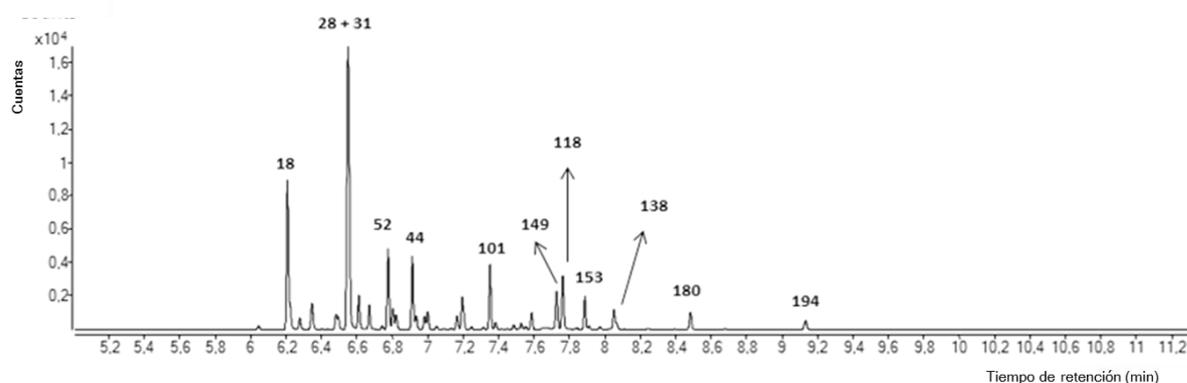
**Figura 5.7** Diagrama de barras donde se compara la concentración ( $\text{ng g}^{-1}$ ) certificada para cada uno de los 12 congéneres de PCBs con la concentración obtenida experimentalmente para el suelo arcilloso CRM 962 utilizando las condiciones de extracción optimizadas

Los valores obtenidos en las figuras anteriores presentan recuperaciones entre el 93-107% con valores de RSD(%) entre 2,5-7,6% para el SRM 1944. En el caso del SRM 1947 las recuperaciones se encuentran entre el 89-101% con una RSD(%) entre 4,9-7%, y para el CRM 962 las recuperaciones se hallan entre el 80-112% con valores de RSD(%) entre 2,4-3,5%. Los resultados que se muestran en las figuras anteriores provienen de tres extracciones independientes inyectadas por triplicado en el equipo GC-EI-MS/MS en modo SRM según las condiciones instrumentales descritas en la Tabla 3.2 de la sección experimental.

Este modo de adquisición SRM hace que los cromatogramas no presenten prácticamente fondo. A modo de comparativa, en la Figura 5.8 se puede observar el cromatograma GC-MS resultante de una de las pruebas de extracción para el material SRM 1944 (sedimento) adquirido en modo SIM (con la selección de tres masas del clúster “natural” y tres masas del clúster “enriquecido” para cada uno de los congéneres de PCBs). Por el contrario, la Figura 5.9 muestra el cromatograma obtenido para el mismo material de referencia en el modo de adquisición SRM (con la medida de dos transiciones para cada uno de los congéneres en estudio como se indican en la Tabla 3.2 del experimental).



**Figura 5.8** Cromatograma GC-MS obtenido en modo SIM para un extracto representativo del sedimento SRM 1944.



**Figura 5.9** Cromatograma GC-MS/MS obtenido en modo SRM para un extracto representativo del sedimento SRM 1944.

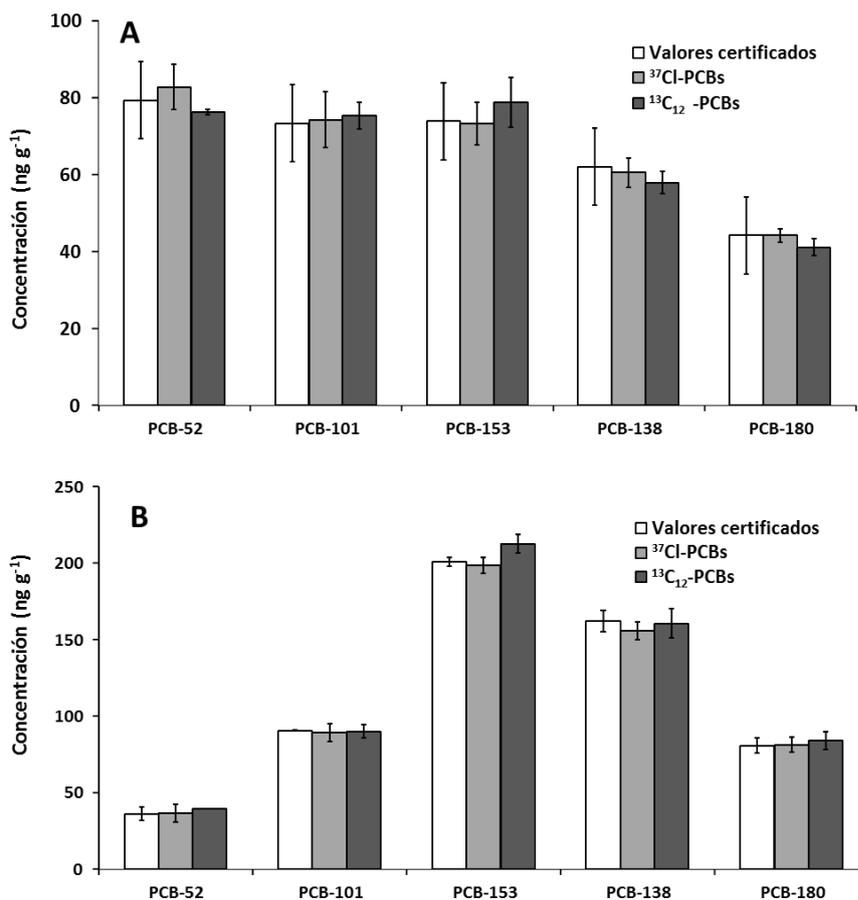
Como puede apreciarse en la Figura 5.8 el modo SIM presenta un fondo importante debido a otros compuestos presentes en la matriz del sedimento, lo que dificulta la integración de los picos cromatográficos. En cambio, la Figura 5.9 muestra cómo el modo SRM facilita la integración de las señales cromatográficas y mejora la relación señal/ruido debido a la ausencia de fondo.

El **límite de detección del método** se determinó haciendo un estudio de los valores del blanco. Para ello se analizaron seis blancos en dos días diferentes añadiendo 0,07 ng de cada uno de los PCBs enriquecidos en <sup>37</sup>Cl. Dentro del artículo científico 1 (en la Tabla S3 de la información complementaria) se observan los valores obtenidos para los PCBs en estudio, salvo para los PCB-180 y 194 que debido a su baja señal no se pudieron determinar. Según se puede observar en la mencionada tabla, los límites de detección

calculados como tres veces la desviación estándar del blanco ( $3S_B$ ) se encontraron en todos los casos por debajo de  $1 \text{ ng g}^{-1}$ .

En este primer artículo científico también se utilizaron congéneres de PCBs marcados en doce átomos de  $^{13}\text{C}$  utilizando como método de cuantificación la aproximación empírica basada en la construcción de un calibrado metodológico. En la sección 3.3.5 del experimental se explica el procedimiento para la construcción del citado calibrado. Para establecer una comparación fiable de ambas metodologías se analizaron el mismo día los mismos materiales de referencia (SRM 1944 y SRM 1947), y se aplicó el mismo procedimiento de extracción utilizando análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  y análogos enriquecidos en  $^{13}\text{C}$ .

En la Figura 5.10 se representan los resultados obtenidos en los materiales de referencia analizados utilizando los análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  y en  $^{13}\text{C}$  para los PCBs 52, 101, 153, 138 y 180 ya que fueron los únicos disponibles comercialmente enriquecidos en  $^{13}\text{C}$ . La parte (A) de la citada figura se corresponde con los datos obtenidos para el material SRM 1944, y la parte (B) corresponde al material SRM 1947. En la Tabla 5.3 se presentan las recuperaciones (%) obtenidas y los valores de RSD(%) de las concentraciones.



**Figura 5.10** Comparación de los valores certificados con las concentraciones experimentales ( $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenidas para los congéneres 52, 101, 153, 138 y 180 en el análisis de A) el SRM 1944 y B) SRM 1947 utilizando análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ -PCBs y análogos enriquecidos en  $^{13}\text{C}$ . Las barras de error corresponden a la desviación estándar obtenida a partir de tres extracciones independientes.

**Tabla 5.3** Recuperaciones (%) y valores de RSD(%) de las concentraciones obtenidas para los congéneres 52, 101, 153, 138 y 180 en el análisis de los materiales de referencia SRM 1944 y SRM 1947 utilizando análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ -PCBs y análogos enriquecidos en  $^{13}\text{C}$ .

Material de referencia	$^{37}\text{Cl}$ -PCBs		$^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs	
	Recuperación (%)	RSD(%)	Recuperación (%)	RSD(%)
<b>SRM1944</b>	98 – 104	4 – 10	93 – 106	1 - 8
<b>SRM 1947</b>	96 – 101	3 – 16	99 – 109	1 - 7

Como se puede observar en la Figura 5.10 y en la Tabla 5.3 no se encontraron diferencias notables entre los dos tipos de análogos enriquecidos en cuanto a exactitud y precisión. Podríamos concluir que de una manera general, se obtienen resultados un poco más precisos utilizando el método del calibrado clásico con análogos enriquecidos en  $^{13}\text{C}_{12}$ . Esto puede ser debido a que utilizando la metodología clásica, no es necesario determinar ni la concentración ni el enriquecimiento isotópico del trazador. Utilizando la metodología basada en el uso de análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ , la incertidumbre de la concentración del trazador y del enriquecimiento isotópico contribuyen a la incertidumbre total de la determinación. Sin embargo, los valores de concentración obtenidos con el uso de los compuestos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ , se asemejan más a los valores certificados de los dos materiales de referencia certificados. Cabe resaltar que una de las ventajas que aporta la metodología descrita y desarrollada en el [artículo científico 1](#) con el uso de análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  es el menor tiempo de análisis debido a que no es necesario construir un calibrado metodológico.

En el desarrollo de la metodología analítica propuesta en el [artículo científico 1](#) se requiere la medida exacta y precisa de la distribución isotópica de los analitos utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Otros analizadores de masa como el TOF y Orbitrap, fundamentalmente empleados en la elucidación de estructuras orgánicas, aunque ofrecen una gran resolución presentan limitaciones significativas en la medida de la composición isotópica de las moléculas. Hoy en día, la evaluación de la

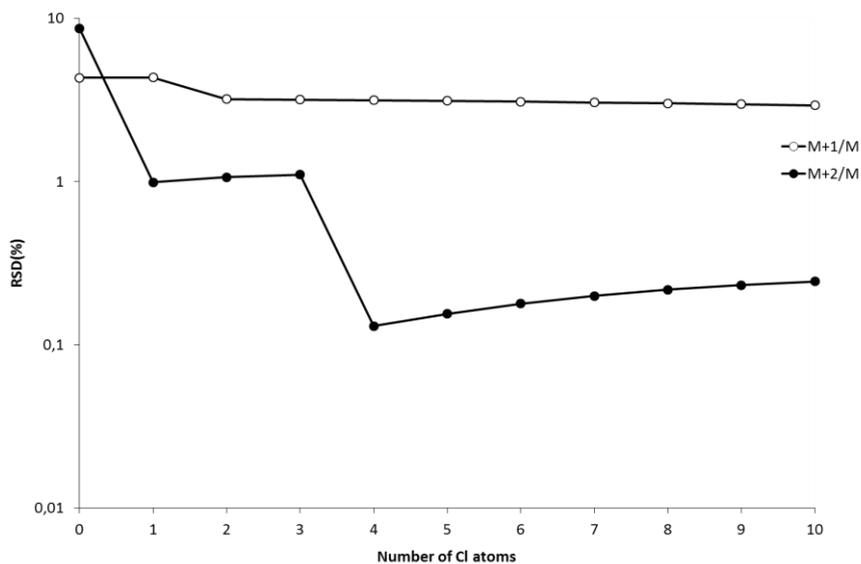
exactitud espectral en equipos comerciales se realiza teniendo en cuenta la relación  $M+1/M$ , donde  $M$  es la abundancia de la masa monoisotópica, y  $M+1$  es la abundancia del isotopólogo que presenta un isótopo de  $^{13}\text{C}$  o de  $^2\text{H}$  en la molécula. Sin embargo, la medida de esta relación de abundancias  $M+1/M$  conlleva una incertidumbre relativa del 4%, incertidumbre demasiado elevada para la correcta evaluación de una medida exacta de las abundancias isotópicas. Como alternativa, en el [artículo científico 2](#) se han desarrollado dos métodos para la evaluación de la exactitud espectral en espectrómetros de masas. La primera se propone para equipos de cuadrupolo sencillo y la segunda para espectrómetros de masas en tándem como el triple cuadrupolo. Ambas metodologías proponen el uso de compuestos halogenados como los PCBs y los bifenil éteres bromados (PBDEs) para evaluar la exactitud en la medida de la composición isotópica de compuestos orgánicos.

Antes de describir los resultados obtenidos en el [artículo científico 2](#) utilizando los métodos propuestos para la evaluación de la exactitud espectral, se calcularon las incertidumbres teóricas de las relaciones  $M+1/M$  y  $M+2/M$  en compuestos orgánicos. Por ejemplo, para una hipotética molécula  $\text{C}_{60}$ , se calcularon las abundancias isotópicas del clúster molecular teniendo en cuenta los valores IUPAC de las abundancias isotópicas de los elementos y sus incertidumbres asociadas utilizando una distribución de probabilidad binomial. De esta forma para una molécula  $\text{C}_{60}$  se obtienen unas abundancias isotópicas de 0,5244 (174), 0,3403 (53) y 0,1086 (64) para los isotopólogos  $M$ ,  $M+1$  y  $M+2$  respectivamente, siendo los valores entre paréntesis la desviación estándar de dichas abundancias.

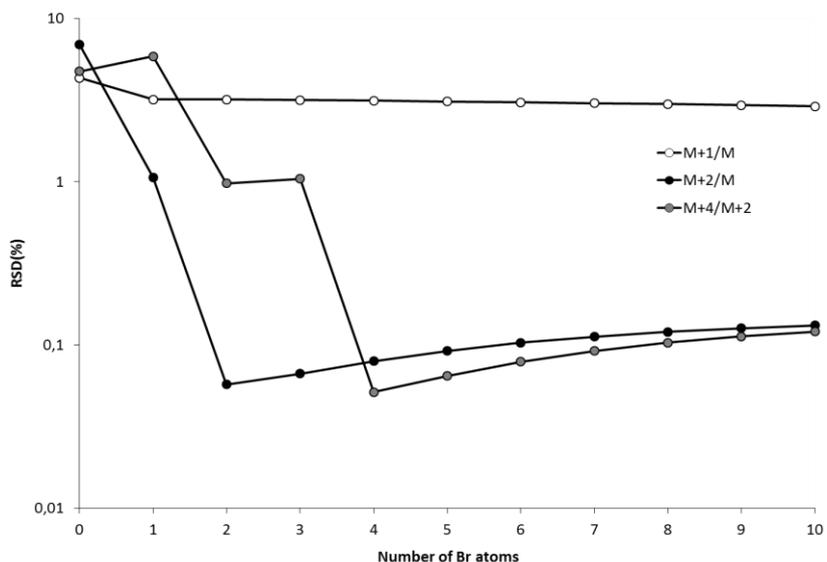
Para cada una de las relaciones  $M+1/M$  y  $M+2/M$  se calculó que la incertidumbre relativa combinada para la molécula  $\text{C}_{60}$  era 4,36% para la relación  $M+1/M$ , y 8,73% para la relación  $M+2/M$ . Normalmente en las moléculas orgánicas aparecen otros elementos químicos como son H, N, y O, además del C. La presencia de estos otros elementos hace que las incertidumbres combinadas para las relaciones  $M+1/M$  y  $M+2/M$  sean algo menores. Por ejemplo, para el péptido de fórmula molecular  $\text{C}_{50}\text{H}_{71}\text{O}_{12}\text{N}_{13}$  la relación  $M+1/M$  es igual a 0,6010 con una incertidumbre relativa de 3,97%. Estas incertidumbres en torno al 4% son demasiado elevadas para evaluar la exactitud espectral de un analizador de masas. Como alternativa se propusieron en el [artículo científico 2](#) compuestos orgánicos halogenados como los PCBs y PBDEs, en los que se pueden medir las relaciones  $M+2/M$ ,  $M+4/M+2$ . Como se puede ver en la Figura

5.11, donde se representa la incertidumbre estándar relativa (RSD%) frente al número de átomos del halógeno (Cl en la parte A para los PCBs y Br en la parte B para los PBDEs), tanto para los PCBs como para los PBDEs, las incertidumbres teóricas para la relación  $M+2/M$  son menores (del orden del 0,1%) que las incertidumbres halladas para la relación  $M+1/M$ . De esta manera se justifica cómo con el uso de estos compuestos orgánicos halogenados y con el cálculo de las relaciones  $M+2/M$ ,  $M+4/M+2$ , etc, las incertidumbres teóricas para dichas relaciones son menores (en torno al 0,1%) con respecto al 4% hallado para la relación  $M+1/M$ .

A



B



**Figura 5.11** Incertidumbres teóricas relativas en función del número de átomos del halógeno para (A) las relaciones  $M+1/M$  y  $M+2/M$  en PCBs y (B) las relaciones  $M+1/M$ ,  $M+2/M$  y  $M+4/M+2$  en PBDEs.

Una vez calculada de forma teórica la incertidumbre asociada a las medidas de las relaciones  $M+1/M$ ,  $M+2/M$  y  $M+4/M+2$  se **evaluó la exactitud espectral en analizadores de cuadrupolo sencillo** utilizando la medida de estas relaciones de isotopólogos. Para ello se realizaron 5 inyecciones independientes en el equipo GC-MS para mezclas de, por un lado varios congéneres de PCBs y, por otro lado de varios

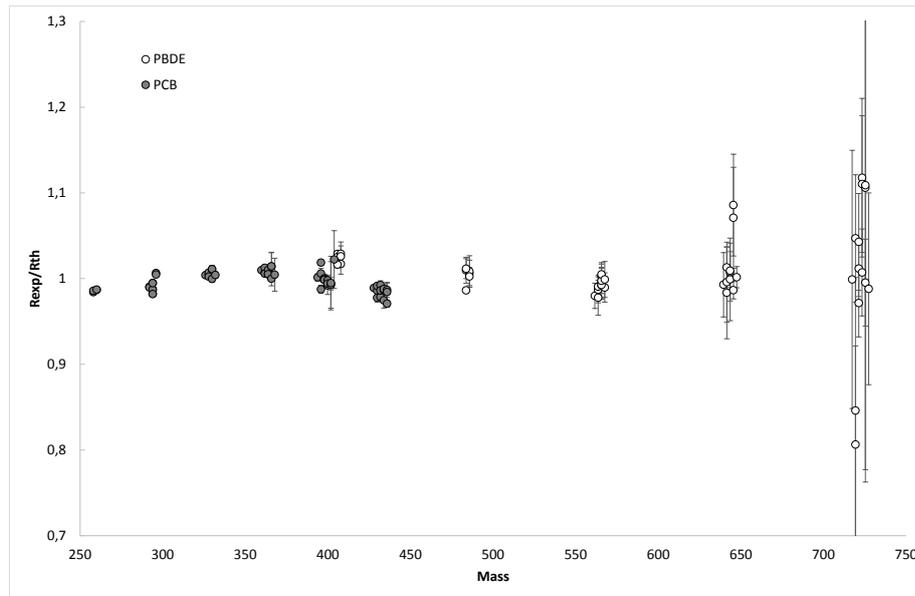
PBDEs. En ambos casos se monitorizaron en modo SIM las distintas masas del clúster molecular, y se calcularon las relaciones  $M+2/M$ ,  $M+4/M+2$ ,  $M+6/M+4$ , etc. Representando estas relaciones experimentales frente a las relaciones teóricas para ambos tipos de compuestos se obtiene una buena correlación entre los valores teóricos y experimentales, con pendientes de 0,9978 en el caso de los PCBs y 0,9946 para los PBDEs con valores de RSD (%) entre 0,2-2% que dependen de la relación calculada y del compuesto. Esta representación puede observarse en la Figura 3 dentro del [artículo científico 2](#). Se demuestra de esta manera que utilizando la medida de las relaciones  $M+2/M$ ,  $M+4/M+2$ ,  $M+6/M+4$ , etc, en compuestos halogenados mediante un sistema GC-MS se puede evaluar la exactitud y precisión de la medida de las abundancias isotópicas.

Además, como puede observarse en la Figura 2 del citado artículo, se representó la relación  $M+1/M$  experimental frente a la relación teórica para los PCBs y PBDEs. En ambos caso se comete un error sistemático, que en el caso de los PCBs depende del número de átomos de Cl en la molécula. Este error sistemático podría deberse a una incompleta resolución del analizador de masas que hace que la masa  $M+2$  se solape con la masa  $M+1$ .

Por otro lado, se llevó a cabo **la evaluación de la exactitud espectral en analizadores de masas en tándem**. Para ello se utilizó un analizador de triple cuadrupolo acoplado a la cromatografía de gases (GC-MS/MS). En este tipo de analizador se suele trabajar en modo SRM (Selected Reaction Monitoring). La reacción más probable cuando se someten los PCBs y PBDEs a procesos de CID (Collision Induced Dissociation) en una celda de colisión es la pérdida de dos átomos del halógeno. La relación de estas transiciones es independiente de la abundancia isotópica natural y depende solamente de permutaciones matemáticas, debido a que tanto el cloro como el bromo poseen dos isotopos estables ( $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$  para el Cloro, y  $^{79}\text{Br}$  y  $^{81}\text{Br}$  en el caso del Bromo). Teniendo en cuenta que los iones precursores pierden dos átomos de halógeno se pueden realizar predicciones del valor de la relación entre las transiciones. Cabe resaltar que es necesario tener en cuenta la presencia de otros elementos en la molécula como son  $^{18}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}_2$  y  $^2\text{H}_2$  que pueden alterar o distorsionar estas predicciones. Por tanto, los valores exactos de las relaciones entre las transiciones se calcularon teóricamente utilizando el software IsoPatrn<sup>2</sup>. Los valores teóricos se muestran en la información complementaria del [artículo científico 2](#) (Tablas S4 y S5), junto con sus incertidumbres

que han sido calculadas utilizando el procedimiento de Kragten<sup>3</sup>. Teniendo en cuenta estos cálculos se observó que la variación natural del C fue la única fuente de incertidumbre significativa en las relaciones de transiciones calculadas, encontrándose que las incertidumbres relativas asociadas fueron menores del 0,1%. Por tanto, se demostró que el procedimiento propuesto era útil para evaluar la exactitud espectral de analizadores de masas en tándem.

Por otro lado se midieron experimentalmente relaciones de transiciones SRM a dos niveles de concentración 10 ppm y 20 ppm tanto para los PCBs como para los PBDEs (ver tablas desde S6 a S9 de la información complementaria del [artículo científico 2](#)). Teniendo en cuentas los resultados obtenidos a estos dos niveles de concentración se puede concluir que no se observaron efectos de la concentración en las relaciones obtenidas. Únicamente se observó una mejora en las desviaciones estándar para las mezclas de 20 ppm a medida que aumentaba el número de halógenos en la molécula. En la Figura 5.12 se representa la relación de las relaciones teóricas y experimentales de las transiciones frente a la masa del ión precursor, tanto para los PCBs como para los PBDEs. En esta figura se pueden observar las elevadas incertidumbres para los PBDEs (sobre todo para los congéneres más bromados) debido a la baja sensibilidad que presentan estos compuestos. En el caso de los PCBs las incertidumbres son menores, entre 1-2%, con errores de exactitud espectral del 2%. Representando las relaciones experimentales frente a las teóricas (como se puede observar en la Figura 6 del [artículo científico 2](#)) existe una buena concordancia entre los valores de las relaciones obtenidos experimentalmente y los valores teóricos, tanto para los PCBs como para los PBDEs, observando incertidumbres mayores en el caso de los PBDEs.



**Figura 5.12** Representación de la relación de las relaciones de transiciones SRM experimentales y teóricas frente a la masa del ión precursor tanto para los PCBs como para los PBDEs.

Una vez propuestos procedimientos para la evaluación de la exactitud de las medidas de las abundancias isotópicas en los analizadores de masas empleados, el siguiente objetivo recogido en el [artículo científico 3](#) fue la comparación de diferentes espectrómetros de masas para la determinación de PCBs mediante dilución isotópica utilizando los análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ . Para ello se siguió el procedimiento de preparación de muestra desarrollado en el [artículo científico 1](#).

La comparativa entre distintos espectrómetros de masas equipados con distintas fuentes de ionización fue posible por la utilización de los compuestos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ . Esto es debido a que, como se ha mencionado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, la marca isotópica se encuentra en el heteroátomo, es decir, en el halógeno. Por tanto, a la hora de llevar a cabo dicha comparación se pudieron utilizar fuentes de ionización elementales, como ICP y NCI con las que se midió la composición isotópica del Cl en cada uno de los congéneres de PCBs estudiados.

La fuente ICP es una fuente muy sensible y muy utilizada para muchos elementos químicos. Sin embargo, el Cl es un elemento muy electronegativo que presenta un elevado potencial de ionización. Esto hace que la eficiencia de ionización de este elemento en el plasma ICP sea muy baja, disminuyendo notablemente la sensibilidad

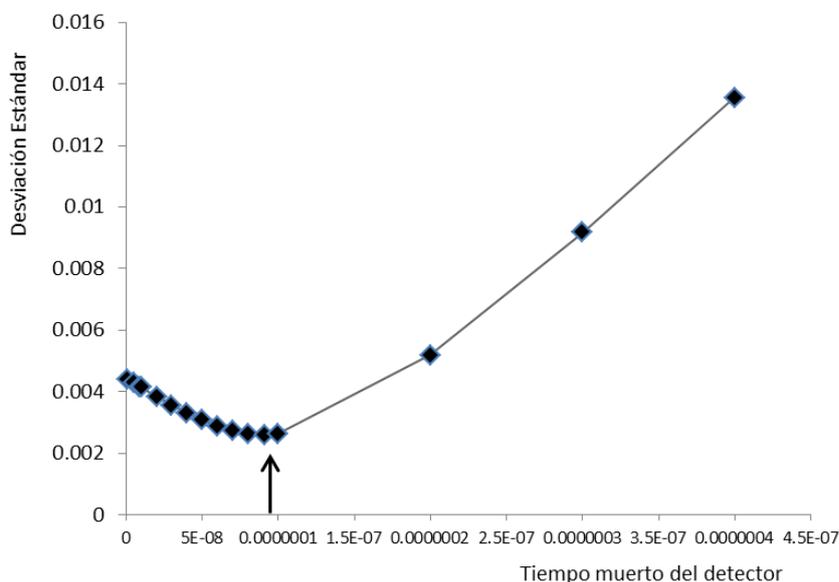
obtenida para compuestos organoclorados. Además, existen interferencias espectrales poliatómicas, generadas en el propio plasma, concretamente  $^{36}\text{Ar}^1\text{H}$  con  $m/z$  37 que interfiere sobre el isótopo  $^{37}\text{Cl}$ . Con la comercialización reciente de equipos ICP-MS/MS triple cuadrupolo, se ha perseguido la mejora en la selectividad, mediante la eliminación de interferencias espectrales. En este trabajo presentado como artículo científico 3 se acopló la Cromatografía de Gases a un equipo ICP-MS de cuadrupolo sencillo y también a un equipo ICP-MS/MS triple cuadrupolo. Mediante la utilización de  $\text{H}_{2(\text{g})}$  en la celda de reacción, las masas  $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$  seleccionadas en el primer cuadrupolo, se transformaron en  $^{35}\text{Cl}-^1\text{H}_2$  ( $m/z$  37) y  $^{37}\text{Cl}-^1\text{H}_2$  ( $m/z$  39), seleccionadas en el segundo cuadrupolo con el objetivo de eliminar cualquier tipo de interferencia poliatómica.

La fuente elemental NCI acoplada a la cromatografía de gases también fue evaluada en el artículo científico 3. Este tipo de fuente elemental de ionización es ampliamente utilizada en la determinación de compuestos orgánicos halogenados debido a su elevada sensibilidad, sin embargo, esta elevada respuesta ante los compuestos halogenados produce al mismo tiempo un elevado fondo espectral en muestras reales, como consecuencia de la presencia de otros compuestos clorados presentes en la matriz de la muestra.

Cabe mencionar que las condiciones instrumentales utilizadas para los equipos se presentan en las Tablas 3.2, 3.3 y 3.4 de la sección experimental.

Para realizar una comparación de las técnicas lo más rigurosa posible fue necesario conocer en primer lugar, **la exactitud y precisión de la medida de la relación isotópica  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  mediante GC-NCI-MS y GC-ICP-MS**. Para ello se, compararon valores experimentales con valores teóricos utilizando PCBs de abundancia isotópica natural. En la fuente NCI fue necesario llevar a cabo la corrección del tiempo muerto del detector ( $\tau$ ). El procedimiento de corrección utilizado se ha descrito en la sección 3.3.2.2 del experimental. El valor del tiempo muerto encontrado ( $9,1 \times 10^{-8}$  s) proporcionó un mínimo en la desviación estándar de las relaciones isotópicas de distintos PCBs cuando se aplica la ecuación 3.4 del experimental como puede observarse en la Figura 5.13.

Por otra parte, la discriminación de masa se corrigió tanto para la fuente NCI, como para la fuente ICP, de acuerdo a la ecuación 3.3 de la sección experimental.



**Figura 5.13** Representación de la desviación estándar obtenida en la medida de la relación  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  en varios congéneres de PCBs en función de distintos valores de tiempo muerto del detector.

La exactitud y precisión en la medida de la relación isotópica  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  utilizando los equipos GC-ICP-MS y GC-ICP-MS/MS se evaluó inyectando en quintuplicado una mezcla de los 12 congéneres de PCBs de abundancia isotópica natural a un nivel de concentración aproximado de unos  $200 \text{ ng g}^{-1}$ . En el caso GC-NCI-MS, la medida de la relación isotópica se evaluó a tres niveles de concentración ( $100 \text{ ng g}^{-1}$ ,  $500 \text{ ng g}^{-1}$  y  $1000 \text{ ng g}^{-1}$ ) para estudiar un posible efecto debido a la concentración.

Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje error relativo (Er) para evaluar la exactitud de las medidas, y se utilizó la desviación estándar relativa RSD(%) para evaluar la precisión de todos estos resultados que se recogen en el [artículo científico 3](#). A modo de resumen en la Tabla 5.4 se presentan los valores recopilados de Er y RSD. Los valores de la relación  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  obtenidos experimentales se compararon con el valor de la relación teórica 0,3200 obtenido de la IUPAC.

**Tabla 5.4** Valores de error relativo  $Er(\%)$  y de desviación estándar relativa  $RSD(\%)$  obtenidos en la medida de la relación isotópica  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  para cada uno de los PCBs objeto estudio de abundancia isotópica natural mediante GC-ICP-MS, GC-ICP-MS/MS y GC-NCI-MS.

Equipo	Er(%)	RSD(%)
GC-ICP-MS	0,6 – 11,2	2,3 – 11,2
GC-ICP-MS/MS	2,8 – 11,9	2,7 – 10,0
GC-NCI-MS	0,01 – 2,6	0,1 – 0,7

Parece claro, a la vista de los resultados que es el equipo GC-NCI-MS el que muestra una medida más exacta y precisa de la relación isotópica  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  con la obtención de los valores más bajos de  $Er(\%)$  y  $RSD(\%)$ . Es necesario destacar también, como la medida de la relación isotópica no se ve afectada en función de la concentración para la fuente NCI. Esto pone de manifiesto la adecuada corrección del tiempo muerto del detector llevada a cabo, así como la ausencia de otros posibles efectos del detector a los niveles de concentración estudiados.

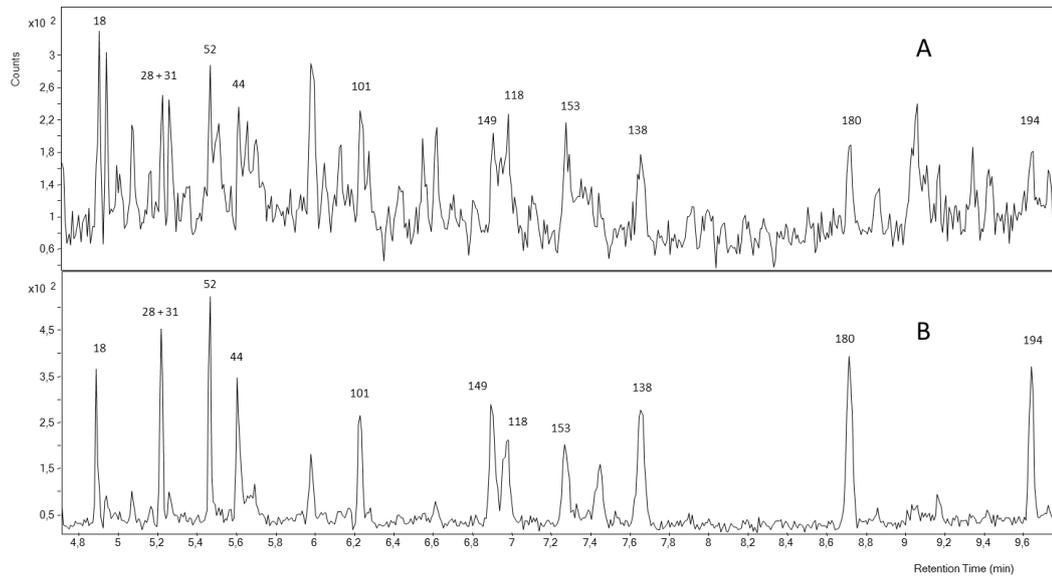
Un vez evaluada la exactitud y precisión obtenida en la medida de la relación isotópica  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  se calculó el **enriquecimiento isotópico** de los compuestos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  utilizando los equipos GC-NCI-MS, GC-ICP-MS y GC-ICP-MS/MS. Dicho enriquecimiento isotópico se calculó directamente con la medida de la relación  $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$  con las correspondientes correcciones del tiempo muerto del detector y la discriminación de masa. En el caso de la fuente molecular EI, el cálculo del enriquecimiento isotópico se ha descrito en la sección 3.3 del experimental y en el [artículo científico 1](#). En la Tabla 2 del [artículo científico 3](#) se pueden observar los valores del enriquecimiento isotópico hallados para cada uno de los congéneres  $^{37}\text{Cl}$ -PCBs estudiados. Comparativamente no se encuentran diferencias significativas entre todos ellos, únicamente existen discrepancias para algunos congéneres para las fuentes NCI y EI con respecto a la fuente ICP, debido a la baja desviación estándar que presentan.

**La concentración de la mezcla** de los análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  se realizó mediante dilución isotópica inversa siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.4 de la sección experimental con cada uno de los equipos comparados. En el [artículo científico 3](#) se presenta la Figura 1 donde se pueden observar los valores discrepantes obtenidos para la mezcla enriquecida. Al no existir valores de referencia para la mencionada mezcla, se asumieron los valores de concentración obtenidos para cada equipo. Dichos valores se emplearon en la determinación de los PCBs objeto de estudio en el **análisis del material de referencia SRM 1941b** (sedimento marino). Es necesario tener en cuenta que para este material de referencia los valores certificados para los PCBs presentes en la matriz se encuentran en un rango entre 1 y 8 ng g<sup>-1</sup>, rango de concentraciones inferior con respecto al material de referencia SRM 1944 utilizado en el [artículo científico 1](#), que se encuentra entre 11-80 ng g<sup>-1</sup>. Además, es necesario remarcar la existencia de otros 30 congéneres de PCBs en el citado material, junto con 7 pesticidas clorados. El protocolo de extracción con el uso del microondas focalizadas es el mismo que el utilizado en el [artículo científico 1](#), descrito con detalle en la sección 3.2.2 del experimental.

Aunque en un primer momento se evaluó el equipo GC-ICP-MS durante el análisis del SRM 1941b, la sensibilidad obtenida no fue lo suficientemente alta para detectar los bajos niveles de concentración de los PCBs en este material de referencia. Además, la presencia de otros compuestos clorados presentes en la matriz dificultaron enormemente la integración de la mayoría de los congéneres en estudio. Cabe resaltar que la dificultad en la integración de los picos cromatográficos también fue debida a una peor resolución derivada de utilizar una columna de 15 m en comparación con la obtenida con una columna de 30 m utilizada en los equipos GC-NCI-MS y GC-EI-MS/MS.

Cuando se utilizó el sistema **GC-ICP-MS/MS** la celda de reacción se presurizó con  $\text{H}_{2(\text{g})}$  para la formación de las especies  $^{35}\text{Cl-H}_2$  ( $m/z = 37$ ) y  $^{37}\text{Cl-H}_2$  ( $m/z = 39$ ). De este modo, se consiguió la eliminación de interferencias poliatómicas procedentes del plasma ICP. La Figura 5.14 muestra un cromatograma representativo del SRM 1941b analizado mediante GC-ICP-MS/MS. La parte A de la figura corresponde a la transición  $^{35}\text{Cl} \rightarrow ^{35}\text{Cl-H}_2$  y la parte B a la transición  $^{37}\text{Cl} \rightarrow ^{37}\text{Cl-H}_2$ . Como se puede observar, el cromatograma obtenido con la transición  $^{35}\text{Cl} \rightarrow ^{35}\text{Cl-H}_2$  no muestra una relación señal/ruido satisfactoria. Además, la presencia de otros compuestos clorados impide una correcta integración de los picos cromatográficos. Utilizando la transición  $^{37}\text{Cl} \rightarrow ^{37}\text{Cl-H}_2$

H<sub>2</sub> se produce una mejora de la relación señal/ruido. Sin embargo, bajo estas condiciones instrumentales solamente se pudo cuantificar los congéneres PCB-28+31, 101, 180 y 194. Los resultados obtenidos para tres extracciones independientes inyectadas por triplicado en el equipo se muestran en la Tabla 5.5.

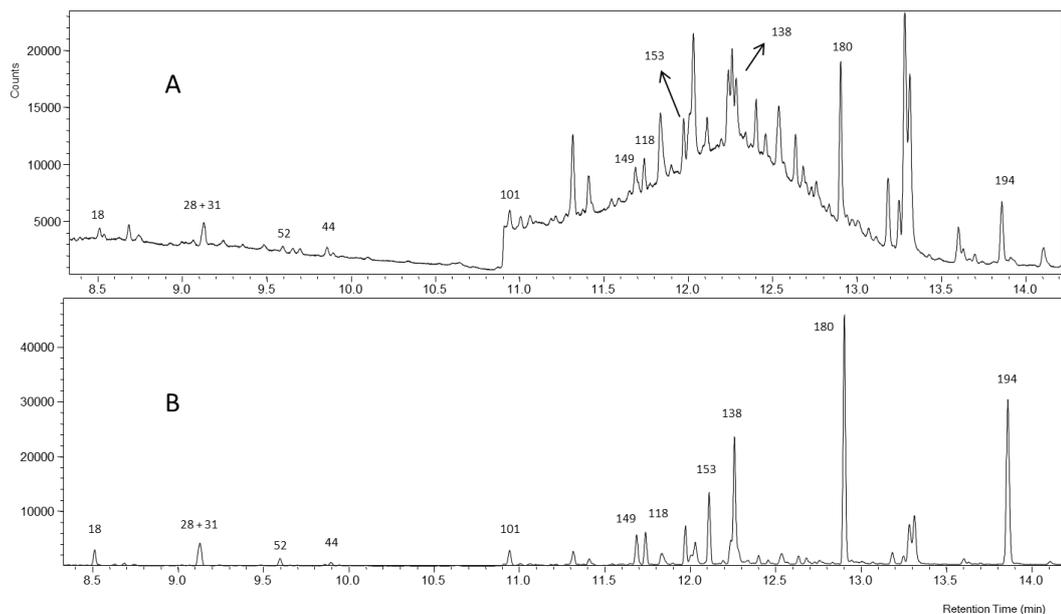


**Figura 5.14** Cromatograma GC-ICP-MS/MS de una muestra representativa del material SRM 1941b obtenido mediante la adquisición de la transición (A)  $^{35}\text{Cl} \rightarrow ^{35}\text{Cl-H}_2$  y (B)  $^{37}\text{Cl} \rightarrow ^{37}\text{Cl-H}_2$ .

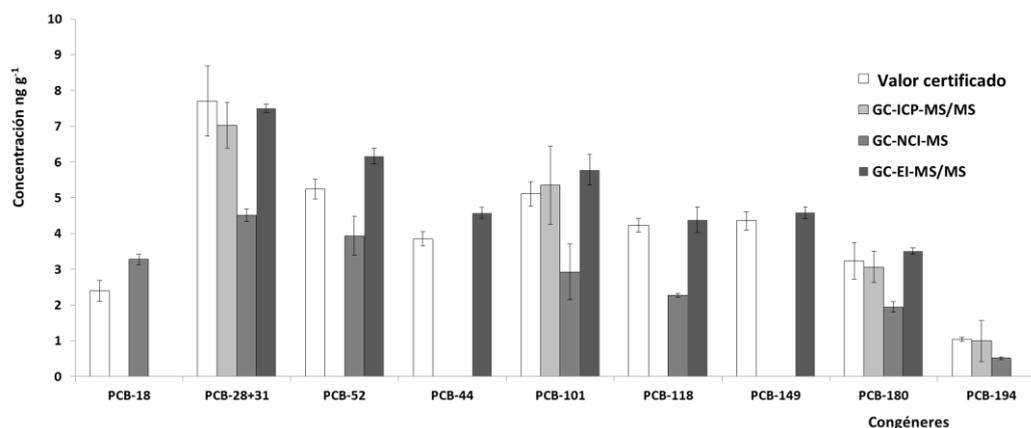
**Tabla 5.5** Valores certificados y experimentales del SRM 1941b obtenidos de  $n=3$  extracciones independientes, inyectadas por triplicado en el equipo GC-ICP-MS/MS.

Congéneres PCBs	Valor certificado	Valor experimental	RSD (%)
	ng g <sup>-1</sup>	ng g <sup>-1</sup>	
<b>PCB-28+31</b>	7,70 ± 0,98	7,0 ± 0,6	9
<b>PCB-101</b>	5,11 ± 0,34	5,4 ± 1,1	20
<b>PCB-180</b>	3,24 ± 0,51	3,1 ± 0,4	14
<b>PCB-194</b>	1,04 ± 0,06	1,0 ± 0,6	57

Cuando se midieron las muestras del SRM 1941b mediante **GC-NCI-MS** se obtuvo la mayor sensibilidad instrumental. En la Figura 5.15 se observan los cromatogramas correspondientes a una de las extracciones llevadas a cabo para el SRM 1941b, donde se muestra en la parte (A) la señal correspondiente a la masa del isótopo  $^{35}\text{Cl}$ , mientras que la parte (B) corresponde al isótopo  $^{37}\text{Cl}$ . La Figura 5.15 muestra un fondo elevado a  $m/z$  35 y la presencia de numerosos picos cromatográficos correspondientes a otros compuestos organoclorados, lo que dificulta enormemente la integración de los picos de los PCBs en estudio. En la Figura 5.16, se muestran las concentraciones teóricas y experimentales obtenidas en el análisis del material SRM 1941b utilizando los sistemas GC-ICP-MS/MS, GC-NCI-MS y GC-EI-MS/MS. En esta figura se observa que cuando se utiliza el equipo GC-NCI-MS, los valores de concentración obtenidos no se encuentran dentro del rango de los valores certificados.



**Figura 5.15** Cromatograma GC-NCI-MS de una muestra representativa del material SRM 1941b obtenido mediante la adquisición de la relación  $m/z$  (A) 35 y (B) 37.



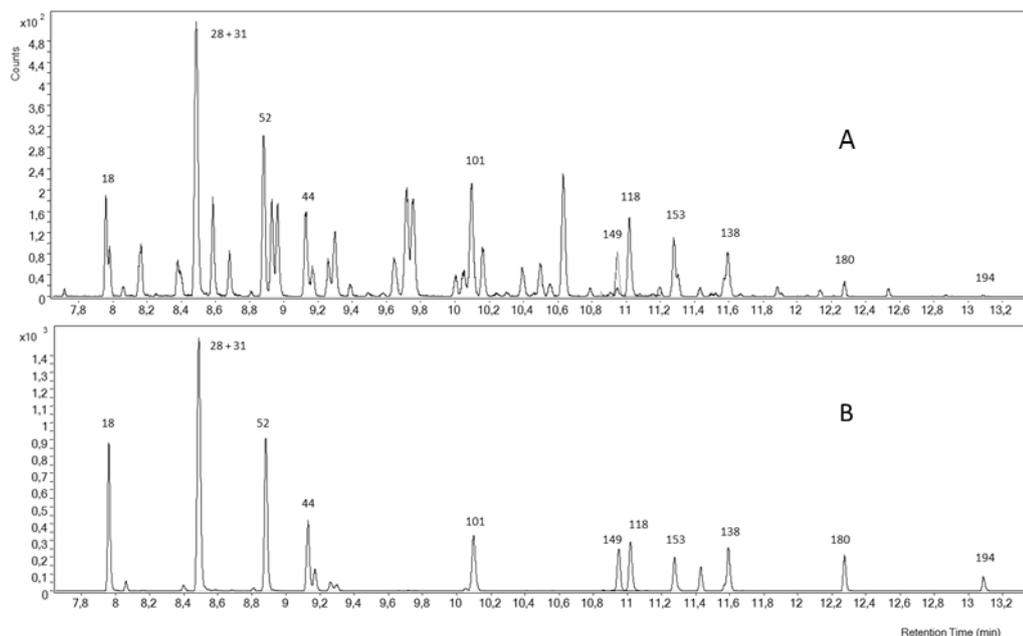
**Figura 5.16** Comparación en  $\text{ng g}^{-1}$  de los valores certificados del material de referencia SRM 1941b con las concentraciones experimentales obtenidas para los congéneres 18, 28+31, 52, 44, 101, 118, 149, 180, 194 utilizando los sistemas GC-ICP-MS/MS, GC-NCI-MS y GC-EI-MS/MS. Los valores experimentales corresponden al promedio de tres extracciones independientes. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de las tres extracciones.

Cuando se utilizó el sistema **GC-EI-MS/MS** se obtuvo la mejor señal/ruido en comparación con las otras técnicas utilizadas en el [artículo científico 3](#). Esto es debido a que midiendo en el modo SRM la única interferencia que puede afectar la integración del pico cromatográfico es la presencia de otro congénere de PCB que eluya al mismo tiempo de retención y que tenga un grado de cloración similar. La Figura 5.17 muestra los cromatogramas GC-EI-MS/MS para una de las extracciones del SRM 1941b, en la parte (A) se muestra el cromatograma perteneciente a las transiciones para los compuestos de abundancia isotópica natural, y la parte (B) muestra las transiciones para los análogos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ . Mediante GC-EI-MS/MS se pudieron determinar todos los congéneres, excepto el PCB-18, 153, 138 y el 194, obteniendo valores de concentración dentro del rango certificado como pueden observarse en la Tabla 5.6. Es necesario tener en cuenta que los congéneres PCB-153 y 138 no han sido cuantificados mediante ninguna de las técnicas empleadas en este trabajo, tratándose por tanto, de un problema debido a una resolución cromatográfica insuficiente.

**Tabla 5.6** Valores certificados y experimentales del SRM 1941b obtenidos de  $n=3$  extracciones independientes, inyectadas por triplicado en el equipo

GC-EI-MS/MS.

Congéneres PCBs	Valor certificado ng g <sup>-1</sup>	Valor experimental ng g <sup>-1</sup>	RSD (%)
<b>PCB-28+31</b>	7,70 ± 0,98	7,5 ± 0,1	1,6
<b>PCB-52</b>	5,24 ± 0,28	6,2 ± 0,2	3,5
<b>PCB-44</b>	3,85 ± 0,20	4,6 ± 0,2	3,3
<b>PCB-101</b>	5,11 ± 0,34	5,8 ± 0,4	7,4
<b>PCB-118</b>	4,23 ± 0,19	4,4 ± 0,4	8,1
<b>PCB-149</b>	4,35 ± 0,26	4,6 ± 0,2	3,7
<b>PCB-180</b>	3,24 ± 0,51	3,5 ± 0,1	2,5



**Figura 5.17** Cromatograma GC-EI-MS/MS de una muestra representativa del material SRM 1941b obtenido mediante la adquisición de (A) las transiciones SRM correspondientes a los PCBs de abundancia isotópica natural y (B) las transiciones SRM correspondientes a los PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ .

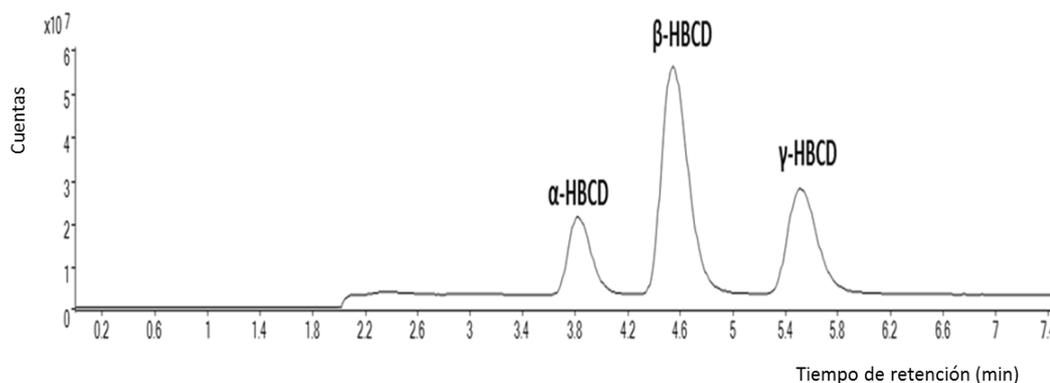
A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que el uso de PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  permitió evaluar distintos analizadores de masas equipados con fuentes de ionización diferentes para la determinación de bajos niveles de concentración de PCBs en muestras sólidas. Los resultados muestran que la utilización de microondas focalizadas permite llevar a cabo una extracción de los PCBs objeto de estudio desde la matriz sólida de una manera eficaz, rápida y con bajos consumos de disolventes de extracción y de material de vidrio. Se puede concluir también que la utilización de un sistema GC-EI-MS/MS de triple cuadrupolo adquiriendo en modo SRM proporciona la mejor señal/ruido y la más eficaz eliminación de interferencias espectrales. Por tanto, esta técnica es la que se recomienda a la hora de determinar PCBs en matrices complejas, como son sedimentos, o matrices biológicas como tejidos de pescado.

En la última parte de la presente Tesis Doctoral, se desarrolló una metodología analítica para la determinación de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del hexabromociclododecano (HBCD). Siguiendo la misma idea descrita en los artículos científicos precedentes de esta Tesis Doctoral, se utilizaron análogos enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$ , con la finalidad de

desarrollar una metodología analítica para la determinación de los isómeros del HBCD en aguas ([artículo científico 4](#)).

El punto de partida para el desarrollo de la metodología fue la **optimización de la separación cromatográfica** de los tres isómeros a línea de base en el menor tiempo posible. Cabe resaltar que al ser diastereoisómeros, los tres compuestos presentan la misma distribución isotópica por lo que es estrictamente necesario conseguir una separación cromatográfica a línea de base, previa a la detección.

Dentro de la información complementaria del [artículo científico 4](#) se muestra un resumen de la optimización de las condiciones cromatográficas. Finalmente, las separaciones se llevaron a cabo utilizando una fase móvil que consistía en 25% de fase móvil A (10 mM NH<sub>4</sub>Ac en agua ultra-pura) y un 75% de fase móvil B (80% MeOH y 20% acetonitrilo) en régimen isocrático y las condiciones experimentales descritas en la Tabla 3.5 del experimental. La Figura 5.18 muestra un cromatograma LC-MS correspondiente a un patrón mezcla de los tres diastereoisómeros a una concentración de 20 µg g<sup>-1</sup>. Como se puede observar se obtiene una separación de los tres compuestos a línea de base.



**Figura 5.18** Cromatograma LC-MS de una mezcla de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD a una concentración aproximada de 20 µg g<sup>-1</sup>, utilizando en régimen isocrático una fase móvil A con un 25% (10 mM NH<sub>4</sub>Ac en agua ultra-pura), y un 75% de fase móvil B (80% MeOH y 20% acetonitrilo).

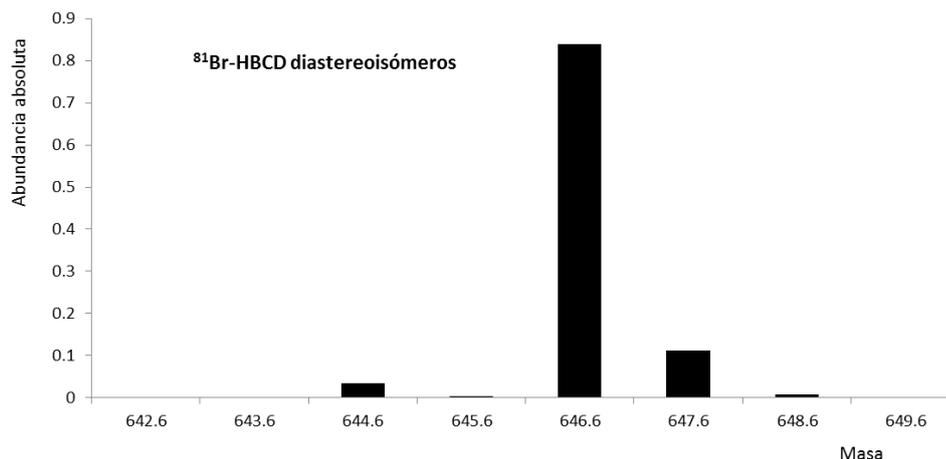
El acetato amónico se empleó para minimizar la formación de aductos de cloro en el clúster del ion. El volumen de inyección también se optimizó, para poder alcanzar los

bajos límites de detección requeridos por la directiva Europea 2013/39/EC. Finalmente se utilizó un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$  tras la reconstitución de la muestra con 25  $\mu\text{L}$  de fase móvil.

Como sucedía en el caso de los PCBs, para llevar a cabo el desarrollo de la metodología IDMS mediante regresión lineal múltiple, es necesario conocer el **enriquecimiento isotópico y la concentración** de los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$ . Los resultados hallados para el enriquecimiento isotópico y la concentración de la mezcla enriquecida se describen en la Tabla 5.7. Como se puede observar, el enriquecimiento isotópico para los tres diastereoisómeros es aproximadamente del 99,3%. En la Figura 5.19 se observa el espectro de masas para las especies  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -HBCD enriquecidas en  $^{81}\text{Br}$  para el clúster de medida  $[\text{M-H}]^-$  en la fuente ESI en modo negativo.

*Tabla 5.7 Valores del enriquecimiento isotópico (%) y la concentración ( $\text{ng g}^{-1}$ ) obtenida empleando distintos procedimientos de medida para los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$ .*

Isómeros HBCD	Enriquecimiento isotópico (%)	Concentración ( $\text{ng g}^{-1}$ ) mediante IDMS inversa			
		SIM m/z desde 636,6 hasta 647,6	SRM 636,6→78,9 646,6→80,9	SRM 638,6→78,9 646,6→80,9	SRM 640,6→78,9 646,6→80,9
$\alpha$ - HBCD	99,35 $\pm$ 0,05	1147 $\pm$ 24	1195 $\pm$ 46	1155 $\pm$ 40	1185 $\pm$ 22
$\beta$ - HBCD	99,30 $\pm$ 0,01	1286 $\pm$ 12	1355 $\pm$ 34	1315 $\pm$ 38	1368 $\pm$ 38
$\gamma$ - HBCD	99,35 $\pm$ 0,05	1341 $\pm$ 12	1356 $\pm$ 58	1393 $\pm$ 56	1376 $\pm$ 34



**Figura 5.19** Espectro de masas teórico de los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$  empleados a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

En la Tabla 5.7 se muestran los valores de concentración obtenidos mediante cuatro métodos de adquisición distintos (un método SIM y tres métodos SRM), donde se varió la transición de abundancia isotópica natural. La transición seleccionada como óptima para llevar a cabo el desarrollo de la metodología fue la transición 638,6→78,9 para los compuestos de abundancia isotópica natural, y la transición 646,6→80,9 para los análogos enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$ . La transición 638,6→78,9 se seleccionó como óptima al presentar unos valores más concordantes con el modo de medida SIM y una menor propagación del error, que permitía trabajar en un rango mayor de proporciones (entre la cantidad de análogo enriquecido añadida y la cantidad de analito presente en la muestra) que para la transición 640,6→78,9, cuyo rango de proporciones es menor (ver [artículo científico 4](#)).

Tras la caracterización tanto en enriquecimiento isotópico como en concentración de la mezcla de los isómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$ , el siguiente paso fue la evaluación del valor del blanco para determinar el límite de cuantificación (LOQ) alcanzado y el estudio de recuperaciones en distintos tipos de aguas.

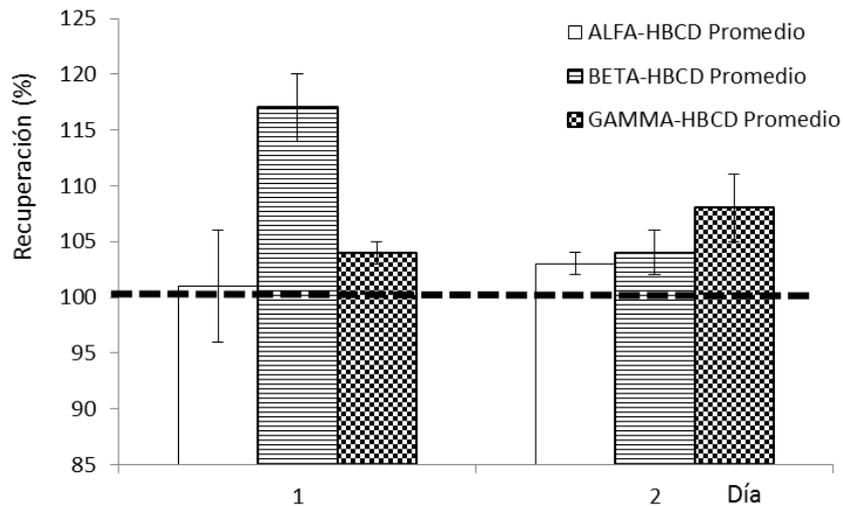
La Directiva Europea 2013/39/EC establece unos valores estándar medios de calidad medioambiental (AA-EQS *annual average environmental quality standard*) en aguas superficiales continentales para la suma de los diastereoisómeros de 1,6 ng L<sup>-1</sup>. Además, otra Directiva Europea 2009/90/EC requiere unos criterios mínimos aplicados a toda metodología analítica de manera que la incertidumbre de las medidas debe ser igual o menor del 50% ( $k=2$ ) del valor EQS (*environmental quality standard*). Esta misma

normativa establece que el límite de cuantificación del método debe ser como mucho el 30% del valor EQS. Según estas normativas se estableció a lo largo de esta Tesis Doctoral un valor EQS de  $0,6 \text{ ng L}^{-1}$ , y un valor LOQ de  $0,18 \text{ ng L}^{-1}$  para cada uno de los tres diastereoisómeros.

En primer lugar, se calculó el **LOQ** utilizando agua ultra-pura según el procedimiento de extracción mencionado en la sección 3.2.3 del experimental. Para ello se analizaron 8 blancos obteniendo unos valores del LOQ entre  $0,011\text{-}0,062 \text{ ng L}^{-1}$ , valores que se encuentran por debajo del valor LOQ de  $0,18 \text{ ng L}^{-1}$  que marca la legislación. Cabe mencionar que los valores del LOQ se calcularon como 10 veces la desviación estándar de los valores del blanco.

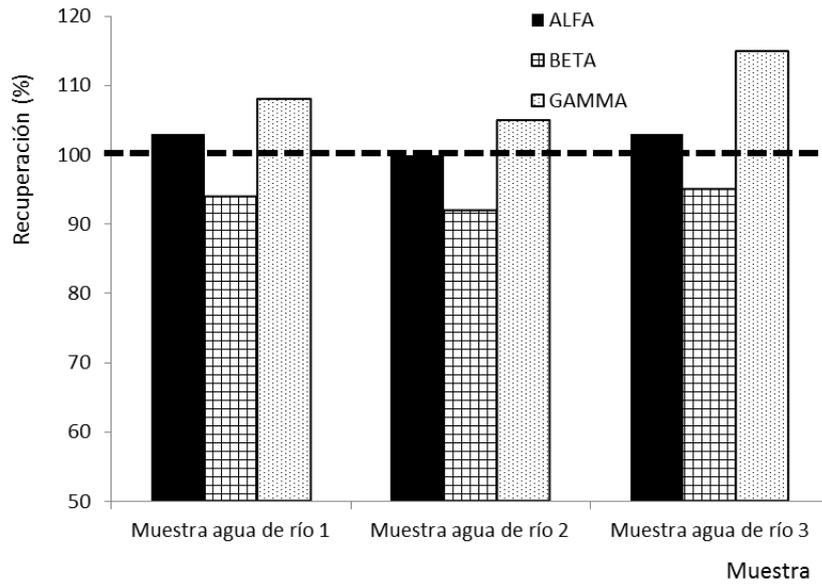
Posteriormente se tomaron muestras en el *Río Color* (Asturias, España) para realizar estudios de blancos complementarios. Un análisis previo realizado a éste agua de río demostró que la concentración de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD se encontraba por debajo de límite de detección del método. De esta manera, la muestra pudo ser utilizada para determinar el LOQ en muestras reales. La estrategia seguida para el cálculo del LOQ en muestras de agua de río fue la misma que la seguida para el agua ultra-pura. En este caso se realizaron tres extracciones independientes en un único día. Los valores del LOQ encontrados para los tres diastereoisómeros en estudio variaron entre  $0,015\text{-}0,073 \text{ ng L}^{-1}$ . Estos valores también se encuentran muy por debajo del valor que marca la legislación de  $0,18 \text{ ng L}^{-1}$ . Con el fin de comparar los valores del LOQ obtenidos tanto para agua ultra-pura como para agua de río se llevó a cabo un test estadístico de Fisher. Este tratamiento estadístico reveló que no existían diferencias significativas entre las desviaciones estándar de los blancos obtenidas para los dos tipos de aguas analizadas para un intervalo de confianza del 95%.

Posteriormente, se evaluó la exactitud de la metodología IDMS propuesta analizando agua ultra-pura fortificada para **calcular los valores de recuperación**. Para ello se analizaron un total de 8 muestras en dos días distintos. En la Figura 5.20 se representan, para los dos días de medida, el promedio de las recuperaciones (%) y la desviación estándar para cada uno de los diastereoisómeros.



**Figura 5.20** Promedio y desviación estándar de las recuperaciones de cada uno de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD obtenidas en 8 muestras de agua ultra-pura a lo largo de dos sesiones de medida.

Para los resultados presentados, se han obtenido valores de la desviación estándar relativa (RSD%) entre el 1-5%. Posteriormente, se realizó un estudio de recuperaciones en muestras del *Río Color* (Asturias, España). Para ello se realizaron tres extracciones independientes fortificando el agua de río con los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD de abundancia isotópica natural a una concentración aproximada de  $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ . Los valores de las recuperaciones obtenidas se muestran en la Figura 5.21. Se obtuvieron recuperaciones del  $102 \pm 2\%$  para el  $\alpha$ -HBCD, del  $94 \pm 2\%$  para el  $\beta$ -HBCD y del  $109 \pm 5\%$  para el  $\gamma$ -HBCD. Los valores de la desviación estándar relativa RSD(%) para los valores de las recuperaciones fueron de entre el 2% y el 4,6%.



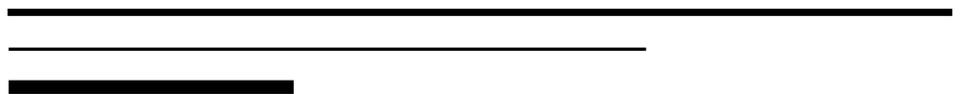
**Figura 5.21** Promedio y desviación estándar de las recuperaciones de cada uno de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD obtenidas en tres muestras de agua de río fortificadas a un nivel de concentración de aproximadamente  $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ .

<sup>1</sup> A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, J. I. García Alonso. **Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry.** Journal of Mass Spectrometry. (2014), 49, 681-691.

<sup>2</sup> L. Ramaley, L. Cubero Herrera. **Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry.** Rapid Communications in Mass Spectrometry. (2008), 22, 2707-2714.

<sup>3</sup> J. Kragten. **Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique.** Analyst. (1994), 119, 2161-2165.

## **6. Conclusiones**





## 6. CONCLUSIONES

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de contaminantes orgánicos halogenados mediante IDMS utilizando análogos enriquecidos en el halógeno en lugar de compuestos enriquecidos en  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$  o  $^{15}\text{N}$ . Los contaminantes para los que se desarrollaron las metodologías analíticas fueron PCBs prioritarios y los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD. Las conclusiones que se pueden sustraer de la presente Tesis Doctoral se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Se ha buscado una alternativa para la cuantificación de PCBs en muestras sólidas con el uso de compuestos enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$ , utilizando la regresión lineal múltiple para realizar la cuantificación mediante IDMS, en el modo de adquisición SRM y sin necesidad de construir un calibrado metodológico previo a la medida de las muestras. Para tal fin se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de los PCBs enriquecidos  $^{37}\text{Cl}$ -PCBs y se ha validado la metodología mediante el análisis de varios Materiales de Referencia Certificados (sedimento, suelo y material biológico). Con el fin de acortar el tiempo de preparación de la muestra se ha utilizado un microondas focalizado para realizar la extracción de los PCBs desde la matriz sólida. De esta manera no solo se ha conseguido minimizar el tiempo de extracción, sino también el material de vidrio utilizado y el volumen de extractante necesario. Se ha comparado la metodología propuesta utilizando  $^{37}\text{Cl}$ -PCBs con la metodología clásica de cuantificación (utilizando  $^{13}\text{C}_{12}$ -PCBs), obteniendo resultados comparables entre ambas metodologías.
- Se han desarrollado metodologías que permiten evaluar la exactitud con la que se llevan a cabo la medida de la distribución isotópica de compuestos orgánicos mediante Espectrometría de Masas. El estudio se llevó a cabo con equipos de cuadrupolo sencillo midiendo las relaciones  $M+2/M$ ,  $M+4/M+2$ ,  $M+6/M+4$ , etc y con de triple cuadrupolo midiendo la relación de transiciones SRM utilizando compuestos halogenados como los PCBs y los PBDEs. De este modo, en ambas metodologías, los valores teóricos con los que se comparan las medidas experimentales no dependen de la variabilidad de las abundancias isotópicas del carbono en la naturaleza. Por tanto, se reducen las incertidumbres relativas de

los valores teóricos al 0,1%, en comparación con los valores de incertidumbre propios de la medida de la relación M+1/M que son del orden del 4%.

- El uso de los PCBs enriquecidos en  $^{37}\text{Cl}$  ha permitido utilizar otros espectrómetros de masa y otras fuentes de ionización como las fuentes ICP o NCI. De este modo, utilizando la Cromatografía de Gases como técnica de separación, se ha realizado una comparación de los equipos ICP-MS, ICP-MS/MS, NCI-MS y EI-MS/MS para la determinación de PCBs mediante análisis por dilución isotópica. La técnica GC-EI-MS/MS proporcionó la mejor relación señal/ruido y los mejores resultados en cuanto a exactitud y precisión. Cabe resaltar que aunque se obtuvo una buena sensibilidad mediante GC-NCI-MS se obtuvieron numerosas interferencias espectrales debido a la presencia de otros congéneres de PCBs y otros compuestos clorados, presentes en la matriz de la muestra. Los equipos GC-ICP-MS y GC-ICP-MS/MS no ofrecieron ninguna ventaja respecto a los resultados obtenidos mediante EI-MS/MS en el modo de adquisición SRM.
- Se ha desarrollado una metodología para llevar a cabo la cuantificación de los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD en muestras de agua de acuerdo a la Directiva Europea 2013/39/EC. Para ello se han sintetizado y caracterizado en enriquecimiento isotópico y concentración los diastereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  del HBCD enriquecidos en  $^{81}\text{Br}$ . Utilizando regresión lineal múltiple y LC(ESI)-MS/MS en modo SRM se obtuvieron límites de cuantificación por debajo de los propuestos en la Directiva y recuperaciones cuantitativas en agua de río, sin la necesidad de construir un calibrado metodológico.

## **7. Factor de impacto**

---

---

---



## 7. INFORME SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO

Los trabajos científicos incluidos en la presente Tesis Doctoral han sido publicados en revistas científicas en el área de *Química Analítica*. Aunque uno de los cuatro trabajos está enviado y en proceso de revisión, se detalla a continuación para todos ellos el título de las revistas científicas, junto con el factor de impacto, calculado según *Journal Citation Reports* (JCR 2014) y la clasificación según el cuartil al que pertenecen en su categoría. Las publicaciones son las siguientes:

- ❖ El artículo científico 1 ha sido publicado en la revista **Analytical Chemistry** con factor de impacto de **5,636** y perteneciente al primer cuartil dentro de su categoría (puesto 4 de 74).
  
- ❖ El artículo científico 2 ha sido enviado a la revista **Journal of Mass Spectrometry** con factor de impacto **2,379** y perteneciente al segundo cuartil dentro de su categoría (puesto 27 de 74).
  
- ❖ El artículo científico 3 ha sido publicado en la revista **Analytical Methods** con factor de impacto de **1,821** y perteneciente al tercer cuartil dentro de su categoría (puesto 42 de 74).
  
- ❖ El artículo científico 4 ha sido publicado en la revista **Journal of Chromatography A** con factor de impacto **4,169** y perteneciente al primer cuartil dentro de su categoría (puesto 6 de 74).



## **8. Trabajo futuro**

---

---

---



### 8. TRABAJO FUTURO

De acuerdo con las metodologías analíticas desarrolladas en la presente Tesis Doctoral y siguiendo la línea desarrollada en las mismas, se proponen algunas sugerencias para desarrollar en futuros trabajos, como son:

- Desarrollo de metodologías analíticas para la cuantificación de contaminantes orgánicos que contienen un heteroátomo en su estructura, listados como sustancias prioritarias en la Directiva 2013/39/UE, en el reglamento 1907/2006 (REACH) o en el Convenio de Estocolmo dentro de la “docena sucia” como pueden ser: terfenilos policlorados, polibromobifenilo, hexaclorobenceno, hexaclorociclohexano, pentaclorobenceno, dicloro difenil tricloroetano (DDT), entre otros. Para ello sería necesario llevar a cabo la síntesis y caracterización de estos compuestos, alterando las abundancias isotópicas del heteroátomo (generalmente se trata de un halógeno).
- Al hilo de la metodología descrita y desarrollada para la evaluación de la exactitud espectral en equipos de cuadrupolo sencillo y equipos de cuadrupolo en tándem, se podría evaluar la exactitud espectral utilizando los compuestos halogenados (PCBs y PBDEs) en equipos con analizadores tipo Orbitrap y tiempo de vuelo (TOF), donde es sabido que las abundancias isotópicas no son medidas de forma exacta y precisa.
- Como se ha comentado a lo largo de la presente Tesis Doctoral los estereoisómeros  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  del HBCD presentan la misma distribución isotópica, de ahí que una separación previa a la detección sea un paso imprescindible en su determinación. Cuando se utiliza la Cromatografía de Gases, no se logran separar estos estereoisómeros, ya que se produce la degradación e interconversión de los mismos en el inyector del equipo. Se plantea la opción de, utilizando distintos marcajes para cada uno de los isómeros, por ejemplo, el isómero  $\alpha$ -HBCD enriquecido en  $^{13}\text{C}_{12}$ , el isómero  $\beta$ -HBCD enriquecido en  $^{81}\text{Br}$ , y el  $\gamma$ -HBCD en  $^{13}\text{C}_6$  o en  $^2\text{H}$ , se podrían cuantificar las distintas especies mediante regresión lineal múltiple.