



## **MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

### **Trabajo Fin de Máster**

**“Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de Cr(VI) en juguetes mediante análisis por dilución isotópica”**

Carlota Gómez Vázquez

**Junio 2014, Oviedo**

# INDICE

---

I.	Introducción .....	4
1.1.	El Cromo .....	2
1.1.1.	Propiedades físico-químicas.....	2
1.1.2.	Aplicaciones y Biodisponibilidad del Cromo.....	3
1.1.3.	Efecto en los seres vivos. Toxicidad en Humanos .....	4
1.1.4.	Legislación .....	5
1.2.	El análisis por Dilución Isotópica con espectrometría de masas.....	6
1.2.1.	La naturaleza isotópica de los elementos .....	6
1.2.2.	Isótopos estables enriquecidos. ....	6
1.2.3.	Análisis por Dilución Isotópica.....	7
1.2.3.1.	Fundamento.....	7
1.2.3.2.	La dilución isotópica en análisis elemental .....	8
1.2.3.3.	Ventajas del análisis por dilución isotópica .....	10
1.2.3.4.	Requisitos del análisis por dilución isotópica .....	10
1.2.3.5.	Dilución isotópica en el análisis de especiación.....	11
1.2.4.	Medida de relaciones isotópicas y abundancias mediante ICP-MS .....	13
1.2.4.1.	ICP-MS .....	13
1.2.4.2.	Cromatografía iónica acoplada a ICP-MS.....	14
1.2.4.3.	Factores que afectan a la exactitud de la medida de relaciones isotópicas.....	14
II.	Objetivos .....	16
III.	Experimental .....	18
3.1.	Instrumentación.....	19
3.2.	Materiales y Reactivos .....	20
3.3.	Procedimientos.....	21
3.3.1.	Caracterización de los trazadores isotópicos empleados:.....	21

3.3.2. Estudio del comportamiento del Cr (III) y Cr (VI) durante la simulación de digestión gástrica propuesta en la normativa UNE-EN 71-3:2013 .....	22
IV. Resultados y Discusión .....	27
4.1. Método de cálculo empleado: La deconvolución de perfiles isotópicos (IPD).....	28
4.2. Caracterización de los trazadores isotópicos empleados: Dilución Isotópica Inversa .....	31
4.2.1. Caracterización de la disolución de <sup>53</sup> Cr (III).....	33
4.2.2. Caracterización del trazador de <sup>50</sup> Cr (VI).....	35
4.3. Estudio del comportamiento del Cr (III) y Cr (VI) durante la simulación de digestión gástrica propuesta en la normativa UNE-EN 71-3:2013.....	37
4.3.1. Experimentos realizados en ausencia de matriz .....	37
4.3.2. Experimentos realizados con muestras reales .....	40
V. Conclusiones .....	44
VI. BIBLIOGRAFÍA.....	46

# I. Introducción

---

## 1.1. El Cromo

El cromo es el sexto elemento más abundante de la corteza terrestre, fue descubierto en Siberia por el químico francés Louis Nicolas Vauquelin en 1798, en forma de mineral rojo de nombre crocoíta y de fórmula molecular  $PbCrO_4$ . El nombre de este elemento procede del griego *chroma*, que significa color, debido a que todos sus compuestos presentan colores marcados (1).

### 1.1.1. Propiedades físico-químicas

El cromo es un metal de transición de número atómico 24 y masa atómica 51,996. Es el primer elemento del grupo 6 en la tabla periódica, se simboliza como Cr y tiene una configuración electrónica [Ar]:  $3d^5 4s^1$ . Tiene una densidad de 7,19 g/ml a 25 °C, un punto de ebullición de 2672°C, funde a 1875°C y tiene una electronegatividad de 1,66. Existen cuatro isótopos naturales del cromo:  $^{50}Cr$ ,  $^{52}Cr$ ,  $^{53}Cr$  y  $^{54}Cr$ , pero también se han producido diversos isótopos inestables mediante reacciones radioquímicas, siendo el más importante el  $^{51}Cr$ , que emite rayos gamma débiles y tiene un tiempo de vida aproximado de 27 días (2).

A pesar de que en la naturaleza los compuestos de cromo presentan una gran variedad de colores, el metal puro es de color blanco-plateado, brillante, duro pero frágil y quebradizo (3). Su estructura cristalina lo ha convertido en un aleante de propiedades interesantes a nivel industrial como son su resistencia al calor y a la corrosión. Se disuelve en ácido clorhídrico y sulfúrico, pero se pasiva con ácido nítrico o agua regia. A elevadas temperaturas reacciona con halógenos, oxígeno, carbón, azufre, silicio y boro (4).

Es muy resistente a la acción de los agentes atmosféricos, lo que resulta extraño dado el carácter fuertemente reductor de este metal. Este comportamiento puede explicarse por el fenómeno de pasivación que tiene lugar. Cuando el cromo metálico está en contacto con el aire se forma una capa de óxido extraordinariamente estable. Esta hipótesis la confirma el hecho de que el óxido de cromo verde, muy empleado en pinturas, es muy estable y resistente (5). Aunque sus estados de oxidación van de (-II) a (VI) las formas más frecuentes son II, III y VI, originando compuestos cromosos, crómicos y cromatos (dicromatos) respectivamente. La mayoría de estos existen como haluros, óxidos o sulfuros. El cromo trivalente destaca como la forma más estable del elemento y la hexavalente por sus propiedades altamente oxidantes.

Los compuestos de cromo hexavalente en su mayoría presentan colores que van desde el amarillo, naranja al rojo oscuro, por lo general son sólidos (cristalinos, granulares o en polvo) y se suelen clasificar por su solubilidad en el agua. Entre las numerosas reacciones que

experimenta destacan las de reducción en condiciones ácidas y presencia de donadores de electrones como el Fe (II) o S (-II).

La forma hexavalente del cromo es la segunda más estable, generalmente en forma de óxido u oxohaluro, es un agente oxidante fuerte, especialmente en medios ácidos, la reducción de dicromatos a Cr (III) se incrementa con la disminución del pH.

### 1.1.2. Aplicaciones y Biodisponibilidad del Cromo

El cromo elemental no se produce naturalmente en la tierra, se obtiene a partir del mineral cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ), por reducción con aluminio (procedimiento aluminotérmico), mediante electrolisis o a través del ioduro crómico. El cromo divalente es un fuerte agente reductor que se descompone rápidamente en el aire o el agua para formar el compuesto crómico relativamente inerte. Los compuestos de cromo (IV) y (V) son relativamente inestables y no son frecuentes en la naturaleza. El cromato raramente se produce en la naturaleza, solo se conoce el cromato de plomo y el dicromato potásico como los minerales crocoíta ( $\text{PbCrO}_4$ ) y lopezita ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) respectivamente, por lo tanto la mayoría del Cr (VI) existente es resultado de la producción del hombre (6).

El cromo se usa ampliamente en procesos industriales pudiendo encontrarse en numerosos productos de consumo tales como madera tratada, cuero curtido o artículos de cocina de acero. El estado de oxidación VI es el que posee una mayor aplicación industrial por sus propiedades ácidas y oxidantes y por su capacidad para formar sales muy coloreadas e insolubles. Cabe destacar su uso en la fabricación de importantes pigmentos inorgánicos, la conservación de la madera o la fabricación de anticorrosivos, vidrios y esmaltes de color. Los compuestos crómicos son muy estables con aplicaciones comerciales, por ejemplo los sulfatos básicos de Cr (III) son ampliamente utilizados en los procesos de curtido. Otros usos conocidos de este elemento son la estampación de telas, preparación de catalizadores, fabricación de aceros especiales...etc.

En el medioambiente se puede encontrar cromo en el aire, suelo y el agua después de ser liberado por las industrias que lo utilizan. El cromo también se libera al medio ambiente al quemar gas natural, petróleo o carbón. Generalmente este elemento no permanece en la atmósfera, sino que se deposita en el suelo o en el agua donde puede cambiar de una forma a otra dependiendo de las condiciones presentes. El comportamiento ambiental del cromo es principalmente una función de su estado de oxidación, los compuestos hexavalentes son oxidantes fuertes altamente solubles mientras que los compuestos de Cr (III) tienden a formar precipitados relativamente inertes a pH próximos al neutro. Se considera que el estado trivalente es la forma estable en equilibrio con la mayoría de los sistemas suelo/agua (7).

### 1.1.3. Efecto en los seres vivos. Toxicidad en Humanos

La toxicidad del cromo es función de la especiación, es decir, depende del estado de oxidación en el que se encuentre el elemento. El Cr(III) es un elemento esencial en mamíferos, siendo uno de los últimos oligoelementos reconocidos, forma parte del factor de tolerancia de la glucosa (FTG), encargado de la eliminación de la glucosa en sangre. El FTG es un complejo de Cr(III), ácido nicotínico y aminoácidos que reacciona con la insulina y potencia su efecto sobre el nivel de la glucosa. También se le ha relacionado de forma más imprecisa con el metabolismo lipídico, la activación de algunos sistemas enzimáticos, con el metabolismo tiroideo y con la estabilización de proteínas y ácidos nucleicos (8).

Metabólicamente el cromo se absorbe primariamente en la zona media del intestino delgado y su retención se regula por la presencia de agentes complejantes necesarios para prevenir su hidrólisis en el medio intestinal. La absorción del cromo trivalente en el aparato digestivo es escasa y puede combinarse con proteínas de las capas superficiales de la piel formando complejos estables, por el contrario las sales de Cr (VI) se absorben fácilmente después de la ingesta o la inhalación, los compuestos en este estado de oxidación son mucho más peligrosos para la salud, la gran toxicidad de los cromatos se debe a su solubilidad y a la facilidad con la que penetra en las membranas, dado su poder oxidante y la toxicidad posterior de las especies de Cr (III) originadas en su reducción. Estudios in vitro (8) indican que el Cr (VI), aunque es relativamente estable, en condiciones fisiológicas se va reduciendo paulatinamente hasta Cr(III).

El cromo hexavalente puede penetrar a través de las membranas celulares de forma libre o complejo, una vez dentro de la célula tanto el Cr(VI) como sus estados de oxidación intermedios pueden reaccionar con el ADN produciendo finalmente tumores. Entre los mecanismos de acción posibles se encuentran: i) la unión covalente del metal con el ADN, ii) formación de uniones cruzadas entre en ADN y proteínas, iii) deterioro de la replicación del ADN la unión de proteínas nucleares o ARN. Los efectos carcinógenos fueron recogidos por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) en 1993 para algunos metales de interés entre los que se encontraba el cromo (9).

En condiciones normales el nivel de cromo en orina debe de ser de 0,04-1,5 µg/l. Tras una intoxicación con cromo hexavalente debe administrarse agua o leche tras su ingestión para diluir el producto y altas dosis de vitamina C para reducirlo a Cr (III); en caso de una exposición cutánea se recomiendan lavados con una solución de ácido ascórbico (10).

#### 1.1.4. Legislación en juguetes

Los juguetes pueden presentar riesgos tanto físicos como toxicológicos para los niños, por lo que garantizar la seguridad de éstos es una tarea difícil. En Europa, los juguetes están sujetos a la Directiva sobre seguridad de los juguetes y la norma EN-71. La norma internacional ISO 8124 es la norma de seguridad del juguete especificada en otros países. Las regulaciones en los Estados Unidos y Europa limitan las concentraciones de cromo y otros elementos, así como una selección de ftalatos en los juguetes (11).

La Organización Internacional de Normalización o ISO, es el organismo encargado de promover el desarrollo de normas internacionales de fabricación, comercio y comunicación. El trabajo de preparación de las normas internacionales normalmente se realiza a través de los comités técnicos, en el caso de ISO 8124-3:2010 fue preparada por el Comité Técnico ISO/TC 181, *Seguridad de los juguetes* (12).

Esta norma consta de cuatro partes entre las que se incluye una para la migración de ciertos elementos. Los requisitos de esta sección de la Norma se basan en la biodisponibilidad de ciertos elementos que resultan del uso de los juguetes y que no debería superar ciertos niveles por día. Para la interpretación de estos valores es necesario establecer un límite superior de ingesta de material del juguete. Como hipótesis de trabajo se propone una ingesta diaria promedio de 8 mg/d, siendo consciente de que en casos individuales este valor podría ser superado. Mediante la combinación de la ingesta diaria con los valores de biodisponibilidad, 0,3 mg para el caso del cromo, se establecen los límites máximos de migración para los diferentes elementos tóxicos en miligramos por kilogramo de material de juguete, este valor para el cromo es de 60 para todos los juguetes excepto para la pintura de dedos y arcilla para moldear que se sitúa en 25 con una corrección analítica del 30%. Por lo tanto para cumplir con los requisitos de ISO 8124-3 la migración máxima aceptable de cromo es de 42 y 17,5 mg/kg para cada tipo de juguete.

La norma española UNE-EN 71-3:2013 recoge la versión oficial de la norma europea que especifica los requisitos y métodos de ensayo para la migración de ciertos elementos a partir de tres categorías distintas de materiales de juguetes. Según esta normativa la migración del cromo desde los materiales de los juguetes clasificados no deben exceder los límites proporcionados en la tabla siguiente, donde se distinguen cantidades distintas según la forma química del elemento:



**Tabla 1 Límites** de migración desde los materiales de los juguetes (UNE-EN 71-3:2013).

	<b>Categoría I</b>	<b>Categoría II</b>	<b>Categoría III</b>
<b>Tipo de material</b>	Secos, quebradizos	Líquidos o pegajosos	Raspados
<b>Cr(III), mg/g</b>	37,5	9,4	460
<b>Cr(VI), mg/g</b>	0,02	0,005	0,2

La seguridad de los juguetes es una responsabilidad conjunta entre los gobiernos, las industrias de juguetes, los organismos reguladores y los padres. Estas normas de seguridad están destinadas a reducir los riesgos potenciales a los que los niños están expuestos al jugar con los juguetes. El cumplimiento de la normativa tiene como objetivo identificar los juguetes que no cumplan con la legislación y eliminarlos del mercado.

## 1.2. El análisis por Dilución Isotópica con espectrometría de masas.

El análisis por dilución isotópica es una técnica analítica basada en la medida de relaciones isotópicas en muestras donde su composición isotópica ha sido previamente alterada por la adición de una cantidad conocida de un elemento o compuesto enriquecido isotópicamente. Cuando se utiliza la Espectrometría de Masas como sistema de detección la técnica se denomina IDAMS (*Isotope Dilution Mass Spectrometry*).

### 1.2.1. La naturaleza isotópica de los elementos

Un isótopo es cada una de las diferentes formas de un mismo elemento que se diferencian en su masa atómica. Todos los isótopos de un elemento de número atómico  $Z$  poseen en su núcleo el mismo número de protones,  $P$ , pero no de neutrones,  $N$ , por lo tanto tienen distinto número másico ( $A=N+P$ ). Existen más de 90 elementos químicos en la naturaleza y cerca de 280 isótopos estables, es decir, aquellos que no decaen en otros ni emiten radiación, por lo tanto, excepto en el caso de los elementos monoisotópicos, un elemento está formado por la mezcla de varios isótopos y su masa atómica es el promedio sopesado de las masas exactas de cada uno de ellos teniendo en cuenta su abundancia.

### 1.2.2. Isótopos estables enriquecidos.

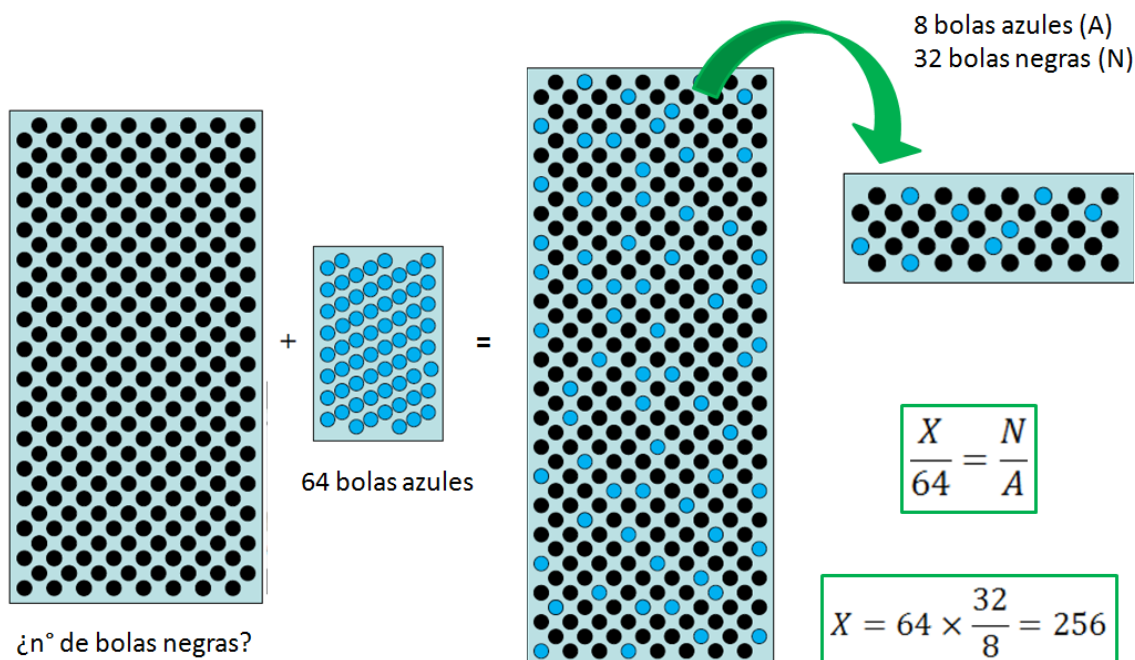
En la actualidad es posible modificar de forma artificial las abundancias isotópicas de los elementos para obtener elementos enriquecidos isotópicamente. Los isótopos estables enriquecidos son aquellos elementos cuya composición isotópica se ha alterado de forma artificial de modo que un isótopo minoritario de un elemento natural se encuentra “concentrado”

en su forma enriquecida. Es decir, un isótopo natural de baja abundancia se encuentra enriquecido a más del 90% mientras el resto de los isótopos están presentes de forma minoritaria. Excluyendo los productos de decaimiento radioactivo, la variación en los porcentajes de las abundancias isotópicas son muy pequeñas. El hecho de que la composición isotópica de un elemento sea invariable permite el desarrollo de métodos químicos de medida basados en la modificación de estas abundancias como el que se emplea en este trabajo. Además, a partir de estos elementos enriquecidos isotópicamente pueden prepararse compuestos químicos de interés marcados con isótopos estables enriquecidos, hoy en día puede considerarse que cualquier compuesto químico de interés analítico puede obtenerse marcado isotópicamente.

### 1.2.3. Análisis por Dilución Isotópica

#### 1.2.3.1. Fundamento

La dilución isotópica se explica de una forma sencilla con un ejemplo como el que se muestra en la imagen que se muestra en la Figura 1 para el cálculo del número de bolas negras de un recipiente. Para no tener que contarlas una a una se mezclan con una cantidad conocida de bolas azules del mismo peso, forma y tamaño que las negras y que solo se diferencian en el color. Una vez homogeneizada la mezcla se toma una alícuota de esta y contando el número de bolas negras y azules se obtiene la relación entre el número total que hay de cada una.



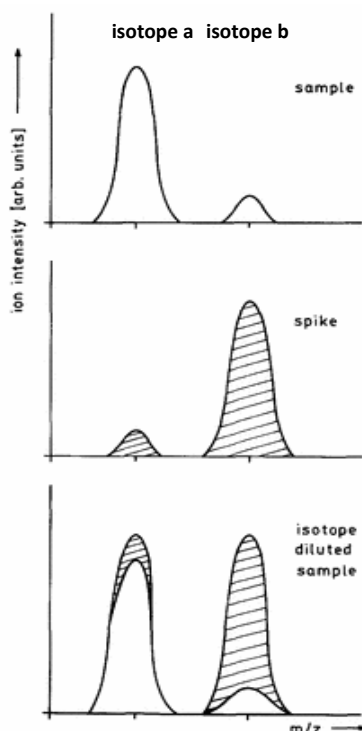
**Figura 1.** Ejemplo que ilustra el análisis por dilución isotópica.

Este concepto de dilución de dilución isotópica como forma de cuantificar fue empleado por primera vez para determinar poblaciones piscícolas en sistemas acuáticos cerrados. Hoy en

día se aplica este mismo principio para la cuantificación de compuestos químicos. Inicialmente se utilizaron isótopos radioactivos pero se ha generalizado su aplicación con isótopos estables enriquecidos, el aspecto más novedoso de la dilución isotópica es que hace uso de la existencia de los isótopos para cuantificar y de la medida de relaciones isotópicas mediante Espectrometría de Masas. Este hecho es el que le proporciona a esta técnica una serie de ventajas únicas con respecto a otras formas de medida y en el que se basa su condición de método primario de análisis ya que es posible conocer todas las posibles fuentes de errores aleatorios y sistemáticos y hacer que el proceso de medida sea trazable al sistema internacional de unidades (13).

### 1.2.3.2. La dilución isotópica en análisis elemental

En análisis elemental, IDA se basa en la alteración intencionada de las abundancias isotópicas del elemento a determinar en la muestra mediante la adición de una cantidad conocida de un isótopo enriquecido del mismo elemento al que se le denomina trazador (*spike*). Por lo tanto el elemento a analizar debe tener al menos dos isótopos estables que se puedan medir sin interferencias espectrales mediante un espectrómetro de masas. La Figura 2 ilustra el principio de esta técnica que se basa en la adicción exacta de una cantidad conocida de trazador, el equilibrio entre este y el analito un proceso de aislamiento si fuera necesario mediante métodos de separación, la medida por espectrometría de masas de la relación isotópica y el cálculo de la concentración del elemento en la muestra (14).



**Figura 2.** Diagrama esquemático del principio de la IDMS obtenido de la referencia (14).

Como puede observarse en la imagen superior, las abundancias isotópicas de la mezcla, y por lo tanto, las relaciones isotópicas, son intermedias entre las de la muestra y el trazador y dependen tanto de la cantidad de trazador añadido como de la cantidad original del elemento en la muestra. Se puede conocer la concentración del elemento en la muestra con la medida de la relación isotópica de la mezcla mediante la aplicación de la ecuación [1]:

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

Donde  $C_s$  es la concentración del analito en la muestra,  $C_t$  es la concentración del trazador;  $m_t$  y  $m_s$  son las masas de trazador y muestra empleadas respectivamente;  $M_t$  y  $M_s$  los pesos atómicos de ambos;  $A_t^b$  y  $A_s^a$  son las abundancias de los isotopos de referencia, el isótopo  $b$  es el más abundante en el trazador y el isótopo  $a$  en la muestra;  $R_t$  es la relación isotópica a/b en el trazador empleado,  $R_s$  es la relación isotópica b/a en la muestra y  $R_m$  es la relación isotópica a/b en la mezcla.

En esta ecuación todos los parámetros son conocidos excepto la relación isotópica de la mezcla  $R_m$ , por lo que la concentración del elemento puede determinarse a partir de la medida de ésta utilizando un espectrómetro de masas. El desarrollo de la ecuación del análisis por dilución isotópica se puede encontrar en varios artículos bibliográficos obteniendo ecuaciones equivalentes, el que se describe a continuación fue descrito por Rodríguez-González y col (15). Si  $N_s$  representa el número de moles de un elemento poliisotópico en la muestra y  $N_t$  los moles de ese elemento en el trazador, la cantidad resultante en la mezcla se puede expresar mediante la ecuación [2]:

$$N_m = N_s + N_t \quad [2]$$

Del mismo modo, se puede hacer el mismo balance de masas para dos isótopos del elemento (ay  $b$ ):

$$N_m^a = N_s^a + N_t^a \quad [3]$$

$$N_m^b = N_s^b + N_t^b \quad [4]$$

Dividiendo las ecuaciones [3] y [4] se obtiene la relación isotópica para los dos isótopos en la mezcla (ecuación [5]):

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_s^a + N_t^a}{N_s^b + N_t^b} \quad [5]$$

Teniendo en cuenta las abundancias isotópicas para cada isótopo en la muestra y en el trazador ( $A_s^a, A_s^b, A_t^a, A_t^b$ ) se puede expresar la ecuación [5] como:

$$R_m = \frac{N_s A_s^a + N_t A_t^a}{N_s A_s^b + N_t A_t^b} \quad [6]$$

Despejando el número de moles de la muestra se obtiene la ecuación [7]:

$$N_s = N_t \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad [7]$$

La ecuación [7] es la forma más básica del cálculo por dilución isotópica. Como se puede observar, sabiendo el número de moles añadidos con el trazador y conociendo la composición isotópica tanto de la muestra como del trazador, se puede calcular el número de moles en la muestra simplemente midiendo  $R_m$ . La ecuación [7] puede adaptarse para obtenerla ecuación [1] que proporciona concentraciones en vez de en número de moles aplicando las conversiones siguientes:  $N_s = (c_s \cdot m_s) / M_s$  y  $N_t = (c_t \cdot m_t) / M_t$ .

### 1.2.3.3. Ventajas del análisis por dilución isotópica

El análisis por dilución isotópica proporciona una serie de ventajas respecto a otros métodos de análisis. Por ejemplo, al contrario que con otras técnicas de calibración, en la ecuación no existe ningún parámetro relativo a la sensibilidad instrumental. Por tanto, los posibles factores que modifiquen la sensibilidad del equipo no afectan al valor final de la concentración  $C_s$ .

Una vez alcanzado el equilibrio isotópico entre muestra y trazador, las pérdidas de sustancia no afectan al resultado final, ya que cualquier alícuota de muestra tendrá la misma  $R_m$  durante todo el proceso.

La incertidumbre en la medida de la concentración depende solamente de la incertidumbre en la medida de las relaciones isotópicas. En la mayor parte de los casos  $R_s$  se conoce y  $R_t$  puede determinarse previamente o conocerse de antemano si se utiliza un trazador con abundancias isotópicas certificadas. Por tanto, el único valor que tiene que ser determinado experimentalmente es  $R_m$  y esta determinación puede realizarse con una elevada exactitud y precisión utilizando un espectrómetro de masas.

### 1.2.3.4. Requisitos del análisis por dilución isotópica

Hay que tener en cuenta que para que un análisis por dilución isotópica proporcione todas las ventajas anteriores se han de cumplir una serie de condiciones, como que no haya pérdidas de analito o de trazador antes de que se produzca el equilibrio isotópico entre ambos. Esta etapa de equilibrio entre el elemento a analizar y el trazador es crítica para una correcta aplicación de un análisis por dilución isotópica. También es importante la ausencia de interferencias espectrales entre las señales de analito y trazador obtenidas mediante

Espectrometría de masas. Además es necesaria una adecuada corrección de los parámetros que afectan a la medida de las relaciones isotópicas como el tiempo muerto del detector y la discriminación de masas, parámetros que se explicaran en apartados posteriores de este trabajo.

A la hora de seleccionar el trazador, generalmente se utiliza un isótopo de baja abundancia natural que no posea interferencias isobáricas, este compuesto debe ser idéntico químicamente al analito ya que actúa como un patrón interno que compensa todas las posibles pérdidas durante el aislamiento de la muestra y el resto de las etapas del proceso analítico.

El empleo del análisis por dilución isotópica para determinaciones elementales totales se ha realizado tradicionalmente utilizando la espectrometría de masas por ionización térmica (TIMS), sin embargo, en los últimos años se ha generalizado el uso del ICP-MS debido a la mayor disponibilidad de este tipo de equipos con los que se obtienen buena precisión y exactitud en la medida de las relaciones isotópicas.

El análisis por dilución isotópica no solo se utiliza para determinaciones elementales sino que también se puede aplicar a la determinación de compuestos químicos, la posibilidad de disponer de diferentes compuestos marcados con  $^{13}\text{C}$  o  $^2\text{H}$  ha permitido ampliar el número de aplicaciones de esta metodología de análisis en campos como la química orgánica, el análisis clínico o la bioquímica entre otros (16).

#### **1.2.3.5. Dilución isotópica en el análisis de especiación.**

Un análisis de especiación es la identificación y determinación de las diferentes formas químicas en las que un elemento está presente en la muestra. En ocasiones es importante conocer, no solo la concentración total del elemento de interés, sino también las distintas formas físico-químicas en las que se encuentra. Por ejemplo en el caso del cromo un análisis de especiación es especialmente importante debido a la diferencia de toxicidad entre sus especies. Los compuestos de Cr (VI) son cancerígenos y muy tóxicos para una gran variedad de organismos mientras que el Cr (III) es un nutriente esencial.

El empleo de la dilución isotópica con espectrometría de masas en este tipo de análisis requiere una etapa previa de separación de las especies que se quieren determinar. La selección de la técnica más adecuada de separación dependerá de la naturaleza de los analitos y de la muestra. La cromatografía de gases (GC) y la de líquidos de alta eficacia (HPLC) son las más comunes, aunque también pueden emplearse otras como la electroforesis capilar (CE). En este trabajo se empleó un cromatógrafo de intercambio iónico acoplado al ICP-MS para separar las dos especies de cromo (Cr (III) y Cr (VI)).

Existen dos modos de aplicar la dilución isotópica a estos análisis de especiación en función del momento y la forma química en la que se añade el trazador isotópico a la muestra.

- Dilución isotópica inespecífica o “post-columna”: En este modo la adición del trazador se produce tras la separación completa de las especies endógenas a la muestra. La ventaja principal reside en que el trazador isotópico puede añadirse en una forma química distinta a la del analito presente en la muestra, por lo tanto resulta muy útil cuando el elemento de interés no pueda sintetizarse, no exista comercialmente o cuando no se conozca exactamente la estructura y composición de las especies a determinar (17). Se debe tener en cuenta al emplear este modo de análisis que es necesario que la eficiencia de la ionización del elemento de interés sea independiente de la forma química en la que se encuentre. Por este motivo la mayoría de los métodos que hacen uso de esta técnica emplean como fuente de ionización una fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP). La gran desventaja de la dilución isotópica inespecífica es que no corrige los errores ocurridos antes de que el trazador se mezcle completamente con la muestra, por lo tanto todos los errores derivados de la preparación de la muestra como pérdidas, diluciones o preconcentraciones no podrán ser corregidas e influirán en el resultado final.
- Dilución isotópica específica. En este caso se requiere de un trazador que contenga las especies a analizar marcadas isotópicamente. Por lo tanto al contrario que en el modo anterior, en el modo específico se tienen que conocer perfectamente la estructura y composición de las especies de interés. El trazador se añade a la muestra al principio del proceso analítico lo que proporciona todas las ventajas de la dilución isotópica convencional una vez se haya alcanzado la mezcla total entre las especies enriquecidas añadidas y las endógenas de la muestra. Otra ventaja importante que proporciona esta técnica es la posibilidad de utilizar trazadores isotópicos múltiples. Estos trazadores están constituidos por una mezcla de las especies en estudio pero cada una de ellas enriquecida en un isótopo diferente. Para la mayoría de los elementos se pueden escoger varios isótopos en los que se pueden enriquecer las diferentes especies a determinar. Esto resulta muy útil cuando se tienen que analizar varias especies del mismo elemento y existe el riesgo de transformaciones entre las mismas. Si cada especie a analizar está marcada con un isótopo distinto es posible realizar la corrección de estas interconversiones y la cuantificación simultánea de todas las especies de la muestra (13).

En este trabajo se aplicó el modo específico utilizando trazadores isotópicos múltiples para la detección de las dos especies de cromo, concretamente Cr (III) enriquecido en el isótopo 53 y Cr (VI) enriquecido en el isótopo 50.

#### 1.2.4. Medida de relaciones isotópicas y abundancias mediante ICP-MS

La espectrometría de masas con fuente de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es la técnica más utilizada para la medida de las relaciones isotópicas con gran precisión y exactitud. Además ofrece una gran sensibilidad para la determinación de un gran rango de metales y no metales a concentraciones a nivel de trazas.

##### 1.2.4.1. ICP-MS

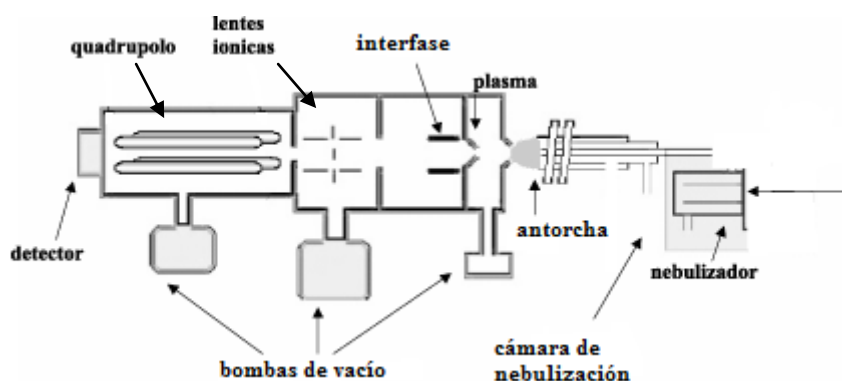
El ICP-MS es el resultado de la combinación de una fuente de ionización elemental de muy alta eficacia, es decir, el plasma de acoplamiento inductivo (ICP) y la espectrometría de masas. Es una técnica de análisis elemental rápida, de alta sensibilidad y multielemental con muchos campos de aplicación. En la Figura se muestra un esquema de un equipo de ICP-MS. Las partes más importantes del equipo son el sistema de introducción de muestra, el plasma como fuente de iones, la interfase de muestreo, el sistema de focalización de iones, el sistema analizador y el sistema de detección. El sistema de introducción de muestra está compuesto por un nebulizador neumático y una cámara de nebulización en el que las muestras líquidas son transformadas en un fino aerosol, del cual solo las gotas más pequeñas son introducidas en el plasma. El plasma consiste en un gas altamente ionizado que se forma cuando un gas inerte (Argón) es sometido a la acción de un campo magnético oscilante producido por una bobina de inducción alimentada por un generador de radiofrecuencias. Las altas temperaturas que se alcanzan en la fuente de ICP aseguran una completa atomización de la muestra y su posterior ionización.

Parte de la población de iones que componen el plasma son transportados a través de la interfase de muestreo al analizador de masas mediante una interfase formada por dos conos: uno de muestreo (*sampler*) y otro separador (*skimmer*). La interfase es necesaria para facilitar el transporte de los iones desde el plasma que está a presión atmosférica al cuadrupolo que opera a alto vacío. El enfoque de los iones a la entrada del analizador se lleva a cabo mediante un sistema de lentes iónicas que coliman y focalizan el haz de iones.

El equipo ICP-MS empleado en este trabajo tiene instalada una celda de colisión/reacción de octapolo que permite la utilización de gases ligeros para eliminar las interferencias poliatómicas. Se puede emplear H<sub>2</sub> como gas de reacción o He como gas de colisión. El analizador es la parte del equipo donde los iones son separados por su masa. El tipo de analizador de masas utilizado en este trabajo es un analizador de tipo cuadrupolo que está



formado por cuatro barras alineadas paralelamente entre si y equidistantes sometidas a voltajes que dejan pasar únicamente la relación  $m/z$  escogida hacia el detector (multiplicador de iones secundarios).



**Figura 3.** Diagrama esquemático de un equipo ICP-MS

#### 1.2.4.2. Cromatografía iónica acoplada a ICP-MS

Como ya se ha comentado el análisis de especiación con ICP-MS requiere de una etapa de separación previa que permita separar las distintas especies de un elemento antes e introducirlas en el ICP-MS. En este trabajo se empleó la cromatografía líquida de intercambio iónico (IC-ICPMS) para la separación de Cr (III) y Cr (VI). La cromatografía de intercambio iónico es un proceso que permite la separación de iones y moléculas polares basada en las propiedades de carga de las moléculas. La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico en la que los analitos se intercambian por los iones de la fase estacionaria y de la fase móvil. En este caso se utiliza una columna de intercambio aniónico para separar las especies de cromo, la forma hexavalente como  $\text{CrO}_4^{2-}$  y la trivalente en forma del complejo aniónico que forma con el ácido etilendianimotetraacético (Cr-EDTA). El método de separación de cationes basado en el uso de aniones quelantes de alta carga está descrito en la bibliografía (18).

#### 1.2.4.3. Factores que afectan a la exactitud de la medida de relaciones isotópicas

- **Interferencias espectrales:** El análisis elemental por dilución isotópica sólo puede llevarse a cabo si al menos dos de los isótopos considerados del elemento a analizar están libres de interferencias espectrales. Para una medida exacta de las relaciones isotópicas debe evitarse la presencia de iones (poli o monoatómicos) que tengan la misma relación masa-carga que los isótopos del elemento que se van a

monitorizar. El empleo del ICP-MS hace que estas interferencias se produzcan a menudo debido a los gases del plasma o a posibles efectos de la matriz. distinguirlos tipos de interferencias más comunes son:

- Interferencias espectrales: todo ion monoatómico o poliatómico que coincide en relación masa nominal/carga con el isótopo de nuestro interés.
- Interferencia isobárica: interferencia espectral que se produce cuando dos elementos diferentes comparten una misma relación masa/carga o isótopo.
- Interferencia poliatómica: se debe a la combinación de dos o más átomos de forma que la suma de sus masas nominales coincide con la masa del isótopo de interés.

- Tiempo muerto del detector: El tiempo muerto del detector se define como el intervalo de tiempo existente entre dos eventos en el que el sistema de detección de impulsos no es capaz de procesar las nuevas señales. Los equipos ICP-MS más comunes, emplean como sistema de detección multiplicadores de electrones o sistemas de conteo de pulsos. En estos instrumentos cuando se producen velocidades de conteo muy elevadas (más de  $10^6$  cuentas por segundo) el efecto del tiempo muerto del detector determina que el número de cuentas registradas sea menor de lo que realmente es. El valor del tiempo muerto del detector de un equipo puede ser calculado e introducido en el software del ICP-MS de modo que realice una corrección automática de todas las intensidades (19).

- Discriminación de masas: El efecto de discriminación de masas es un error sistemático que se produce en el ICP-MS debido a la transmisión preferente de los isótopos más pesados a través del espectrómetro de masas frente a los más ligeros. Si este efecto no se corrige, una relación isotópica medida experimentalmente llevará asociada un error sistemático respecto a la relación isotópica real o teórica que será proporcional a la diferencia de masa entre los isótopos. Estudios anteriores demuestran que el efecto de discriminación de masa se origina tanto en el vacío de la interfase de extracción, “efecto orificio” como en el sistema de lentes iónicas debido a efectos de “espacio-carga” (20)

## **II. Objetivos**

---

El objetivo principal del presente Trabajo Fin de Máster es la aplicación del análisis por dilución isotópica empleando trazadores isotópicos múltiples para la evaluación de la Norma UNE-EN 71-3: 2013. Concretamente se persigue el estudio de la estabilidad de las especies de Cr durante el proceso de migración detallado en la norma UNE-EN 71-3 para muestras de juguetes de la categoría III (materiales de raspado). El proceso de migración detallado en la norma no debería producir la interconversión redox del Cr(III) y el Cr(VI) y por tanto debería mantener la identidad de ambas especies a lo largo del proceso para poder evaluar correctamente la toxicidad de las muestras estudiadas. Sin embargo, la determinación simultánea de ambas especies requiere la aplicación de diversas etapas de preparación de muestra que pueden inducir la interconversión redox de las especies. La metodología analítica empleada en este Trabajo Fin de Máster se basa en el uso de especies de Cr enriquecidas isotópicamente, cada una en un isótopo de Cr distinto, de modo que permita la corrección de las interconversiones producidas durante el análisis y así poder diferenciarlas de las producidas durante el proceso de migración. Este objetivo general se abordó a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Caracterización de las especies de Cr(III) y Cr(VI) enriquecidas isotópicamente: determinación de su concentración por dilución isotópica inversa y de su composición isotópica.
2. Estudio de la interconversión redox entre el Cr(III) y el Cr(VI) durante el proceso de migración detallado en la Norma UNE-EN 71-3 para los materiales de juguetes de categoría III (material de raspado) en ausencia de matriz sólida.
3. Estudio de la interconversión redox entre el Cr(III) y el Cr(VI) durante el proceso de migración detallado en la Norma UNE-EN 71-3 para los materiales de juguetes de categoría III (material de raspado) en presencia de distintas matrices de juguetes (recubrimientos de pinturas, telas y papel o cartón).

### **III. Experimental**

---

### 3.1. Instrumentación

En el desarrollo de este trabajo se empleó un equipo de cromatografía iónica acoplada a un espectrómetro de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (IC-ICP-MS).

#### Cromatografía líquida

La separación del Cr (III) y Cr (VI) se llevó a cabo utilizando un sistema HPLC Dionex DX-120 (Sunnyvale, CA, EEUU) con una columna de intercambio aniónico Dionex AS9-HC con unas dimensiones de 4 mm diámetro x 250 mm de longitud y un tamaño de partícula de 9 µm, y con un loop de inyección de 20 µL. Esta columna tiene una fase estacionaria polimérica de divinilbenceno/etilvinilbenceno con amonio cuaternario como grupo funcional y su hidrofobicidad es media-baja. Como fase móvil se empleó una disolución de EDTA 5mM a pH 10 y se usó un flujo de 1 mL/min.

#### ICP-MS

El equipo ICP-MS utilizado para la detección del cromo fue un equipo Agilent 7500c de la casa Agilent Technologies (Tokyo, Japón), equipado con una celda de colisión de tipo octapolo y un nebulizador tipo Meinhard de flujo concéntrico. Las condiciones experimentales en las que se realizaron los análisis se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Condiciones experimentales para la especiación de cromo por HPLC-ICP-MS.

Parámetro	Ajustes
ICP-MS	Agilent 7500c
Potencia RF	1500 W
Flujo de gas portador (Ar)	1.14 L/min
Bomba peristáltica	0.1 rps
Cell entrance	-46 V
QP focus	-12V
Cell exit	-76 V
Octapole bias	-18 V
QP Bias	-16 V
Flujo de He en la celda	4 mL/min
Tiempo de integración	0.1 s
Isótopos monitorizados	50, 52, 53, 54

### Sistema de microondas

Para la complejación del Cr (III) con EDTA se utilizó un sistema de microondas focalizadas modelo Explorer-Hybrid de la empresa CEM corporation (Matthews, NC, EEUU). Este sistema permite controlar la potencia, la temperatura, el tiempo, la presión y la agitación de las muestras durante la aplicación de las microondas. El equipo se controla por ordenador e incluye un automuestreador. El programa empleado fue un tiempo de 5 minutos a 80 °C con agitación magnética.

## **3.2. Materiales y Reactivos**

Se empleó para la preparación de las disoluciones, tanto de los patrones como de las muestras una balanza analítica AB204-S (Mettler Toledo, Zurich, Suiza), ya que todas las disoluciones se prepararon por pesada para una correcta corrección gravimétrica de las mismas. El control del pH de las disoluciones se hizo con un medidor de pH Basic 20 (Crison, Barcelona, España). Para la incubación de las muestras se utilizó una placa calefactora con agitación magnética IKA RCT Basic (Staufen, Alemania) con un termómetro de contacto electrónico IKA, ETS-D5/D6 para garantizar que la temperatura del baño de agua no sobrepasara el valor seleccionado. Todos los reactivos que se usaron en este trabajo fueron de grado analítico:

### Patrones de cromo enriquecidos

Se prepararon disoluciones de 10 y 100 ppm a partir de disoluciones marcadas isotópicamente proporcionadas por la empresa ISC-Science (Oviedo, España) de cromo hexavalente enriquecido en el isótopo 50 en hidróxido sódico diluido y de cromo trivalente marcado en el isótopo 53 en ácido nítrico al 2%.

### Patrones de cromo naturales

Se prepararon dos disoluciones patrón con abundancias isotópicas naturales de Cr (VI) y Cr (III). La disolución de Cr (VI) natural se preparó a partir del compuesto  $K_2Cr_2O_7$  (Sigma-Aldrich, ref. 42019, 99.5%, 294.18 g/mol), en NaOH diluido, se ajustó a pH 10 con NaOH concentrado. Se obtuvo una concentración aproximada de 1500ppm. Se preparó una disolución patrón de Cr (III) de 100ppm a partir de la disolución comercial de cromo trivalente en ácido nítrico (Sigma-Aldrich, ref 94238, 1 g/L). Se diluyó con  $HNO_3$  al 2%.

### Otros reactivos

Se prepararon disoluciones acuosas de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 5, 20 y 50mM a partir del sólido hidratado  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 99% (Sigma-Aldrich). Se ajustaron todas las disoluciones a pH 10 con una solución de amoníaco (Sigma-Aldrich). Para utilizarlas como disolvente y fase móvil.

Se usaron también disoluciones de ácido clorhídrico 0.07 M y ácido nítrico al 2 %, ambas preparadas a partir de los ácidos purificados mediante destilación. Las disoluciones acuosas de hidróxido de sodio se prepararon a partir del compuesto sólido al 98% de pureza (Sigma-Aldrich). Toda el agua empleada, tanto como disolvente como para el lavado fue  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura obtenida en un sistema Mili-Q (Millipore Co, Bedford, EEUU).

## **3.3. Procedimientos**

### **3.3.1. Caracterización de los trazadores isotópicos empleados:**

Los trazadores isotópicos empleados  $^{50}\text{Cr}$  (VI) y  $^{53}\text{Cr}$  (III) a lo largo de este trabajo se caracterizaron por dilución isotópica inversa. En este tipo de análisis los patrones naturales se utilizan para cuantificar los trazadores. Para ello es necesario medir experimentalmente la concentración y la composición isotópica de los trazadores empleados.

Para cuantificar la disolución de cromo hexavalente enriquecido en el isótopo 50 se preparó una mezcla de la disolución del trazador con el patrón natural en EDTA 5 mM a pH 10. Se partió de disoluciones de 10 ppm y se prepararon tres mezclas pesando cerca de 0,1 g del Cr de abundancia isotópica natural y 0,1 g del enriquecido isotópicamente ya que deben estar en una relación aproximadamente 1:1. También se preparó otra disolución de  $^{50}\text{Cr}$  (VI) en EDTA 5mM para el cálculo de abundancias isotópicas en la disolución del trazador.

Para cuantificar la disolución de cromo trivalente enriquecido en el isótopo 53 también se realizaron tres mezclas, pero en este caso se utilizaron soluciones más concentradas porque el cromo trivalente se tiene que derivatizar mediante complejación con una disolución de EDTA 50mM. Para ello, se pesaron aproximadamente 0,1 g del patrón de Cr (III) natural de 100ppm y otros 0,1 g de la disolución enriquecida en  $^{53}\text{Cr}$  (III) también de 100 ppm y se llevaron hasta 10 g con EDTA 50 mM a pH 10. Los tres tubos donde se realizaron las mezclas se introdujeron en un baño de agua y se incubaron las disoluciones durante una hora a 70 °C. En estas condiciones el Cr (III) forma un complejo con el EDTA. Después las tres replicas se diluyeron 1:10 con  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ para que la concentración de EDTA coincida con la de la fase móvil empleada en la



separación cromatográfica. Para el cálculo de las abundancias isotópicas se preparó una disolución solo con el trazador y EDTA que también tiene que ser incubada y diluida.

#### .Disolución para la corrección de la discriminación de masas

Como se comentó en la introducción, cuando se miden relaciones isotópicas mediante ICP-MS se produce un error sistemático que se conoce como discriminación de masas debido a que los isótopos más pesados se transmiten de manera más efectiva que los ligeros. La discriminación de masas se corrige mediante la medida adicional de un patrón natural que proporciona el valor del factor de discriminación de masas. Como se miden ambas especies de Cr en el mismo cromatograma, preparamos una única disolución pesando 0,1 g de las disoluciones de Cr (VI) y de Cr (III) naturales de 100 ppm en EDTA 50 mM. Se incubó durante una hora en un baño de agua a 70 °C y después se diluyó de la misma manera que las disoluciones anteriores.

### **3.3.2. Estudio del comportamiento del Cr (III) y Cr (VI) durante la simulación de digestión gástrica propuesta en la normativa UNE-EN 71-3:2013**

Como se explica en la introducción de este trabajo, la normativa española vigente en relación a la seguridad de los juguetes es una traducción literal, sin modificación, de la Norma Europea EN-71. La tercera parte de esta normativa (EN 71-3:2013) especifica los requisitos y los métodos de ensayo para la migración de ciertos elementos (entre los que se encuentran el Cr (VI) y el Cr (III)) desde los materiales y partes de los juguetes. Estos requisitos se aplican a aquellos juguetes o partes de juguetes que puedan suponer un riesgo debido a la succión, el lamido, la ingestión o el contacto prolongado con la piel cuando el juguete se usa en la forma intencionada o previsible teniendo en cuenta el comportamiento de los niños. Los materiales del embalaje no están considerados a no ser que tengan un valor lúdico.

En la Norma se clasifican los materiales en tres categorías:

- Categoría I: materiales secos, quebradizos, similares al polvo o flexibles.
- Categoría II: materiales líquidos o pegajosos.
- Categoría III: materiales raspado.

Se especifica que los elementos solubles se extraen de estos materiales empleando unas condiciones que simularían el material cuando está en contacto con los jugos gástricos durante un período de tiempo después de su ingestión y propone tres métodos distintos para la determinación de su concentración según el elemento a analizar.

Para el procedimiento de migración se mezcla la porción de ensayo de la muestra del material con una disolución acuosa de ácido clorhídrico al 0,07 M a temperatura ambiente. Se agita la mezcla durante un minuto y se comprueba su pH, este debe estar comprendido entre 1,0 y 1,5, si es superior se ajusta con una solución de HCl 2 M. Se protege la mezcla de la luz y se agita durante una hora a  $(37 \pm 2)$  °C continuamente tras la cual se deja reposar durante otra hora a la misma temperatura. Después de esto se separa el sólido de la disolución. La norma indica que tras la etapa de migración hay que neutralizar directamente la disolución para prevenir las conversiones de las dos especies de cromo. En este trabajo se evaluó el comportamiento del Cr (VI) y Cr (III) durante la migración de la muestra, para ello se llevaron a cabo adiciones de patrones naturales de cada analito a disoluciones en blanco y a disoluciones que contienen las muestras reales objeto de estudio.

La determinación de las especies en la disolución de migración solo requiere, una etapa de complejación, realizada en microondas a 80 °C para garantizar que todo el Cr (III) en la disolución se compleja con el EDTA y conseguir una óptima separación cromatográfica. El proceso de preparación de la muestra puede producir conversiones en los analitos pero éstas se pueden corregir mediante la adición de trazadores isotópicos múltiples que se añaden antes del comienzo de la aplicación de las microondas focalizadas (21).

#### Toma y preparación de las muestras

Para este análisis se seleccionaron como muestras tres tipos de materiales distintos pertenecientes a la categoría III de la norma UNE-EN 71-3:2013. Como material de recubrimiento, la pintura de un puzle de madera; como textil el vestido de una muñeca y como material de papel o cartón, una baraja de cartas infantiles (Figura ).

Para la obtención de la porción de ensayo se procedió de distinta manera según el tipo de material. El material de recubrimiento se separa mediante acción mecánica, raspando con unas tijeras la superficie del material para arrancar la pintura. Del puzle se seleccionaron piezas distintas para obtener muestras de dos pinturas de diferente color, en ambos casos la porción de ensayo no fue inferior a 100mg. Del textil y del cartón se obtienen las muestras de 100mg a partir de probetas de ensayo que se recortan de aproximadamente una dimensión de 6mm.



**Figura 4.** Fotografías de los juguetes comerciales de los cuales se obtuvieron los materiales que se utilizaron como muestra.

#### Patrones naturales

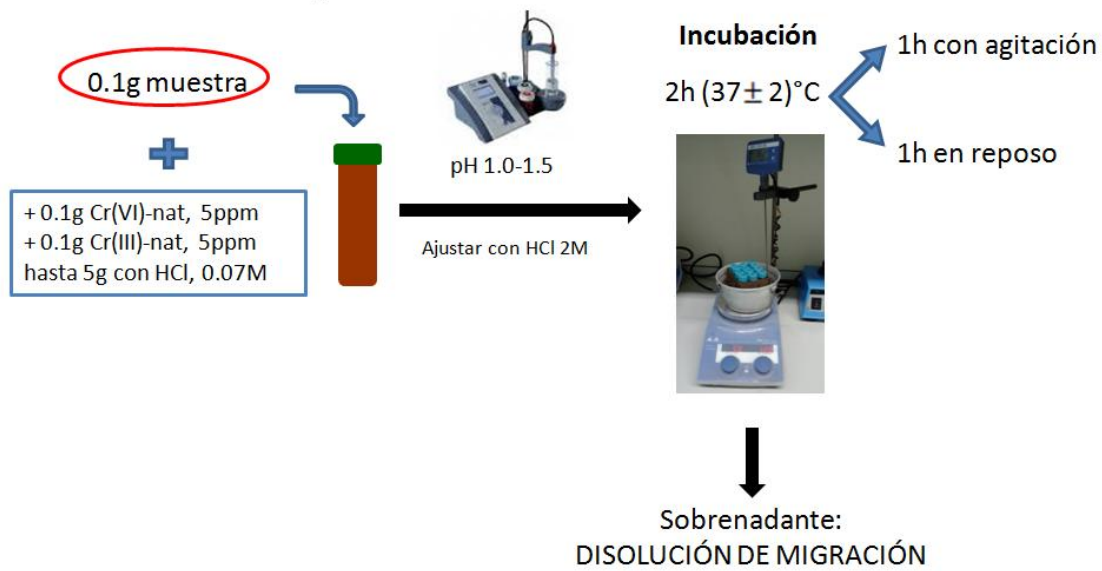
Se prepararon dos disoluciones de 5 ppm de Cr (VI) y Cr (III) de abundancias isotópicas naturales a partir de las disoluciones patrón que se habían preparado anteriormente. Estas disoluciones servirán para el estudiar las recuperaciones y observar cómo afecta el proceso de migración a ambas especies de cromo.

#### Trazadores isotópicos

Se prepararon disoluciones de 100 ppb de los dos elementos enriquecidos a partir de las que se dispone de mayor concentración. El trazador de Cr (VI) enriquecido en el isótopo 50 se realiza diluyendo el patrón de 10ppm en NaOH diluido y el de Cr (III) enriquecido en el isótopo 53 en nítrico al 2%.

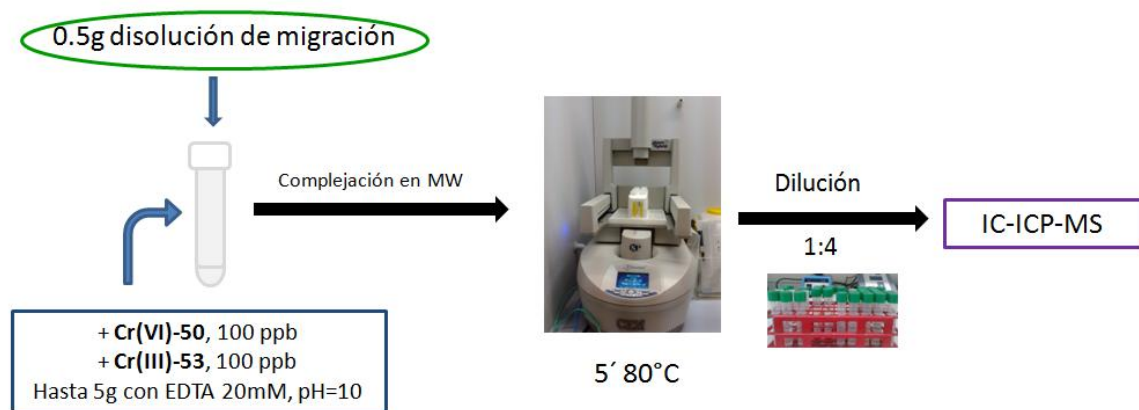
El procedimiento que se siguió en la realización del análisis se muestra en la Figura 5 y en la Figura . En primer lugar se realizó el procedimiento de migración que se indica en la Figura , en un vial de vidrio ámbar se añadieron 100 mg del material de juguete, se añadieron 0.1 g de cada una de las disoluciones de patrones naturales de 5 ppm, y se añadió ácido clorhídrico 0.07M hasta aproximadamente 5 g. Se comprobó el pH de la disolución resultante

con un medidor de pH, si es superior a 1.5 se ajusta añadiendo gota a gota una solución de HCl 2M hasta conseguir un pH entre 1.0-1.5. Los viales se introdujeron en un baño de agua a  $(37\pm 2)$  °C como se muestra en la Figura donde se mantuvieron una hora con agitación y otra en reposo. Pasado el tiempo de incubación se recogió con una pipeta la solución que queda sobre el sólido constituyendo la disolución de migración.



**Figura 5.** Esquema del procedimiento de migración realizado a lo largo de este trabajo siguiendo la norma UNE-EN 71-3:2013.

Una vez obtenida la disolución de migración se cogen 0.5 g de ésta y se echan en un vial de microondas, se añaden los trazadores isotópicos de  $^{50}\text{Cr}$  (VI) y  $^{53}\text{Cr}$  (III), 0.5 g de cada uno y se lleva la disolución hasta 5 g con EDTA 20 mM a pH 10. Las disoluciones se introducen en un sistema de microondas focalizadas como el que se muestra en la Figura 4. Para realizar la complejación del cromo trivalente, se utiliza un programa de 5 minutos a 80 °C. Después se procedió a la dilución de las muestras para obtener una concentración similar a la fase móvil que se utiliza (EDTA 5mM) en el sistema IC-ICP-MS.



**Figura 6.** Esquema de la preparación de muestra empleada para el análisis de la disolución de migración obtenida según la norma UNE-EN 71-3:2013.

La determinación de cromo mediante ICP-MS aplicando IDMS no es sencilla debido, tanto a las interferencias isobáricas producidas por el hierro,  $^{54}\text{Fe}$ , como a las interferencias poliatómicas de diferentes isótopos producidas por carbono, oxígeno, cloro y argón que provienen de la fase móvil (EDTA), el gas del plasma (Ar) o de la matriz. El uso de la celda de colisión y el empleo de helio como gas de colisión puede reducir estas interferencias significativamente. Por otra parte, las interferencias isobáricas debidas al  $^{54}\text{Fe}$  se evitan mediante el uso del sistema cromatográfico con tubería de PEEK (*polyetheretherketone*) y componentes que no tienen acero al contrario que los sistemas tradicionales. La Tabla 1 recoge las interferencias más importantes en la determinación de los isótopos de Cr mediante ICP-MS.

**Tabla 3.** Composición isotópica del cromo natural y principales interferencias.

Isotopo Cr	50	52	53	54
Abundancias (%) <sup>a</sup>	4.3452	83.7895	9.5006	2.3647
<b>Interferencias isobáricas</b>				$^{54}\text{Fe}$
<b>Interferencias poliatómicas</b>	$^{38}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^1\text{H}^+$	$^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^1\text{H}^+$ $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$

## **IV. Resultados y Discusión**

---

#### 4.1. Método de cálculo empleado: La deconvolución de perfiles isotópicos (IPD)

La deconvolución de perfiles isotópicos (IPD, *Isotope Pattern Deconvolution*) es una herramienta matemática que puede ser aplicada a cualquier problema analítico que utilice isótopos estables enriquecidos tanto en análisis inorgánico, orgánico y bioquímico como para especiación metálica y metabolismo mineral.

Se define perfil isotópico como el conjunto de abundancias isotópicas relativas de todos los isótopos estables de un elemento. La suma de todas las abundancias isotópicas relativas de cualquier perfil isotópico es uno (o 100% si se utilizan abundancias expresadas en átomos por ciento). El perfil isotópico puede medirse experimentalmente, por ejemplo como se realiza en el presente trabajo mediante la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo.

El perfil isotópico natural es aquel que posee un elemento que se encuentra en la naturaleza. Para la mayoría de los elementos es constante e invariable en toda la Tierra. Las abundancias isotópicas naturales de los elementos están tabuladas incluyendo sus incertidumbres. En el perfil isotópico alterado de un elemento la abundancia relativa de uno o varios isótopos estables es claramente distinta a la natural. Normalmente, en estos perfiles isotópicos alterados un isótopo se encuentra en una abundancia isotópica relativa más elevada que en el elemento natural (isotopo enriquecido) mientras que el resto de los isótopos tiene una abundancia menor.

La deconvolución de perfiles isotópicos utiliza la regresión lineal múltiple para calcular la contribución de varios perfiles isotópicos distintos de un mismo elemento al perfil isotópico medido experimentalmente para ese elemento en la muestra. El resultado de este proceso matemático es la fracción molar de cada uno de los perfiles isotópicos en la muestra. Esta fracción molar es la cantidad de moles correspondiente a un determinado perfil isotópico de un elemento dividida por la cantidad de moles totales de ese mismo elemento en la muestra analizada (22).

La principal diferencia entre esta técnica quimiométrica y las ecuaciones utilizadas tradicionalmente en Dilución Isotópica es el uso de abundancias en lugar de relaciones isotópicas.

A continuación se deducirán las ecuaciones de IPD utilizadas en este trabajo. Para ello se consideran tres perfiles isotópicos distintos: el perfil isotópico natural del elemento y los perfiles isotópicos alterados de dos trazadores enriquecidos  $t1$  y  $t2$ .

El balance de masas para el número de moles totales del elemento en la muestra,  $N_m$ , viene dado por:

$$Nm = Nnat + Nt1 + Nt2 \quad [9]$$

Donde  $Nnat$  es el número de moles desconocidos del elemento de abundancia isotópica natural y  $Nt1$  y  $Nt2$  los moles del elemento correspondientes a los dos perfiles isotópicos alterados en la muestra. Este balance de masas de la ecuación [9] se puede hacer para todos los isótopos,  $i$ , del elemento que configuran su perfil isotópico (para el caso del cromo se podría realizar para sus cuatro isótopos: 50, 52, 53 y 54).

$$N_m^i = N_{nat}^i + N_{t1}^i + N_{t2}^i \quad [10]$$

La ecuación [10] se puede expresar como una combinación lineal de la cantidad total de moles del elemento en cada uno de los perfiles isotópicos y de las abundancias isotópicas:

$$Nm \times A_m^i = N_{nat} \times A_{nat}^i + N_{t1} \times A_{t1}^i + N_{t2} \times A_{t2}^i \quad [11]$$

Donde,  $A_m^i$ ,  $A_{nat}^i$ ,  $A_{t1}^i$  y  $A_{t2}^i$  son las abundancias isotópicas del isótopo  $i$  en cada uno de los perfiles isotópicos. La abundancia de la mezcla puede medirse y la del perfil isotópico natural se puede conocer porque están tabuladas por la IUPAC. Dividiendo la ecuación [10] entre la ecuación [11] se obtiene:

$$A_m^i = X_{nat} \times A_{nat}^i + X_{t1} \times A_{t1}^i + X_{t2} \times A_{t2}^i \quad [12]$$

Donde se definen las fracciones molares como:

$$X_{nat} = \frac{N_{nat}}{N_{nat} + N_{t1} + N_{t2}}, X_{t1} = \frac{N_{t1}}{N_{nat} + N_{t1} + N_{t2}} \quad \text{y} \quad X_{t2} = \frac{N_{t2}}{N_{nat} + N_{t1} + N_{t2}}$$

Si el elemento utilizado posee  $n$  isótopos estables (siendo  $n \geq 3$ ), se pueden establecer un sistema de ecuaciones lineales representado en forma matricial por la ecuación [13].

$$\begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ A_m^2 \\ \dots \\ A_m^{n-1} \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{t1}^1 & A_{t2}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{t1}^2 & A_{t2}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{t1}^3 & A_{t2}^3 \\ \dots & \dots & \dots \\ A_{nat}^{n-1} & A_{t1}^{n-1} & A_{t2}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{t1}^n & A_{t2}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{t1} \\ X_{t2} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad [13]$$



Como hay más ecuaciones que incógnitas (fracciones molares) la matriz se puede resolver por ajuste de mínimos cuadrados obteniendo los valores de las fracciones molares  $X_{nat}$ ,  $X_{t1}$  y  $X_{t2}$ . Para ello se puede utilizar la función “Estimación Lineal” del programa EXCEL de Microsoft Office (13).

Finalmente, como se conoce el número de moles añadidos a la muestra se puede conocer el número de moles del elemento de abundancia isotópica natural mediante la ecuación [14]:

$$\frac{X_{nat}}{X_{t2}} = \frac{N_{nat}}{N_{t2}} \quad [14]$$

La ecuación [14] es válida siempre y cuando no existan interconversiones entre los analitos pero no son válidas cuando se producen transformaciones de las especies del elemento a lo largo del análisis.

En el caso del cromo si ocurren este tipo de transformaciones debido a los procesos de oxidación/reducción entre las especies de Cr (III) y Cr (VI). Para corregir estas interconversiones se definen los factores de degradación,  $F1$  como la cantidad relativa de Cr(VI) que se transforma a Cr(III) y  $F2$  como la cantidad de Cr(III) transformada en Cr (VI).

A continuación se explican los cálculos que se utilizaron en este trabajo para el caso concreto del cromo, partiendo de los balances molares correspondientes a cada especie en una mezcla que contiene la muestra,  $m$ , un trazador enriquecido con  $^{50}\text{Cr(VI)}$ ,  $t_1$ , y un segundo trazador marcado con  $^{53}\text{Cr(III)}$ :

$$N_m^{Cr(III)} = N_{nat}^{Cr(III)} + N_{t1}^{Cr(III)} + N_{t2}^{Cr(III)} \quad [15]$$

$$N_m^{Cr(VI)} = N_{nat}^{Cr(VI)} + N_{t1}^{Cr(VI)} + N_{t2}^{Cr(VI)} \quad [16]$$

Las matrices aplicadas a la especie de Cr trivalente para la obtención de las fracciones molares en la muestra y en los trazadores y a la especie de Cr (VI) son las siguientes respectivamente:

$$\begin{bmatrix} A_{m,Cr(III)}^{50} \\ A_{m,Cr(III)}^{52} \\ A_{m,Cr(III)}^{53} \\ A_{m,Cr(III)}^{54} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat,Cr(III)}^{50} & A_{t2,Cr(III)}^{50} & A_{t1,Cr(III)}^{50} \\ A_{nat,Cr(III)}^{52} & A_{t2,Cr(III)}^{52} & A_{t1,Cr(III)}^{52} \\ A_{nat,Cr(III)}^{53} & A_{t2,Cr(III)}^{53} & A_{t1,Cr(III)}^{53} \\ A_{nat,Cr(III)}^{54} & A_{t2,Cr(III)}^{54} & A_{t1,Cr(III)}^{54} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{nat}^{Cr(III)} \\ X_{t2}^{Cr(III)} \\ X_{t1}^{Cr(III)} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{50} \\ e^{52} \\ e^{53} \\ e^{54} \end{bmatrix} \quad [17]$$

$$\begin{bmatrix} A_{m,Cr(VI)}^{50} \\ A_{m,Cr(VI)}^{52} \\ A_{m,Cr(VI)}^{53} \\ A_{m,Cr(VI)}^{54} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat,Cr(VI)}^{50} & A_{t2,Cr(VI)}^{50} & A_{t1,Cr(VI)}^{50} \\ A_{nat,Cr(VI)}^{52} & A_{t2,Cr(VI)}^{52} & A_{t1,Cr(VI)}^{52} \\ A_{nat,Cr(VI)}^{53} & A_{t2,Cr(VI)}^{53} & A_{t1,Cr(VI)}^{53} \\ A_{nat,Cr(VI)}^{54} & A_{t2,Cr(VI)}^{54} & A_{t1,Cr(VI)}^{54} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{nat}^{Cr(VI)} \\ X_{t2}^{Cr(VI)} \\ X_{t1}^{Cr(VI)} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{50} \\ e^{52} \\ e^{53} \\ e^{54} \end{bmatrix} \quad [18]$$

Una vez obtenidos los valores de las fracciones molares, la cantidad total de Cr (III) y Cr(VI) en la mezcla ( $N_m^{Cr(III)}$  y  $N_m^{Cr(VI)}$ ) se puede calcular con las cantidades añadidas a la mezcla de los trazadores,  $t_1$  (de Cr(VI)) y  $t_2$  (de Cr(III)) y las ecuaciones siguientes:

$$N_{t1,Cr(VI)} = X_{t1}^{Cr(VI)} \cdot N_m^{Cr(VI)} + X_{t1}^{Cr(III)} \cdot N_m^{Cr(III)} \quad [19]$$

$$N_{t2,Cr(III)} = X_{t2}^{Cr(VI)} \cdot N_m^{Cr(VI)} + X_{t2}^{Cr(III)} \cdot N_m^{Cr(III)} \quad [20]$$

Aplicando los factores de degradación:



Finalmente se obtienen las concentraciones corregidas para la muestra resolviendo el siguiente sistema de ecuaciones:

$$\left. \begin{aligned} X_{nat}^{Cr(III)} \cdot N_m^{Cr(III)} &= N_m^{Cr(VI)}(1 - F2) + F1 \cdot N_m^{Cr(VI)} \\ X_{nat}^{Cr(VI)} \cdot N_m^{Cr(VI)} &= N_m^{Cr(VI)}(1 - F1) + F2 \cdot N_m^{Cr(III)} \end{aligned} \right\} \quad [21]$$

## 4.2. Caracterización de los trazadores isotópicos empleados: Dilución Isotópica Inversa

Para poder evaluar el comportamiento del cromo en la disolución de migración tras la simulación gástrica de los materiales de los juguetes mediante el análisis por dilución isotópica es necesario conocer la concentración exacta de los patrones marcados isotópicamente que se utilizaran en la cuantificación. Por este motivo la primera parte de este trabajo consistió en caracterizar y cuantificar las disoluciones de los dos trazadores que se emplearon después. Esto se llevo a cabo mediante dilución isotópica inversa.

La dilución isotópica inversa consiste en el uso de patrones naturales de cromo de concentración perfectamente conocida para obtener la concentración de los trazadores enriquecidos isotópicamente. Se caracterizaron los trazadores de  $^{50}\text{Cr}(\text{VI})$  y  $^{53}\text{Cr}(\text{III})$  mediante HPLC-ICP-MS. El uso de este equipo hace necesario corregir el efecto de la discriminación de masas que ya se nombro anteriormente (los átomos más pesados se transmiten mejor que los más ligeros).

En este trabajo se ha asumido una dependencia lineal de este efecto con la diferencia de masa de los isótopos en los que se mide la relación. La discriminación de masas se corrige mediante la medida de un patrón natural que proporciona el valor del factor de discriminación de masas,  $K$ . El valor de  $K$  se calculó a lo largo de este trabajo antes y después de cada tres medidas de las muestras. A estas tres medidas se les aplica la media de los valores de  $K$  obtenidos antes y después. El factor de discriminación de masas se calculó en este trabajo mediante la ecuación [22]

$$K = \frac{R_{\text{experimental}} - R_{\text{teórica}}}{R_{\text{teórica}} \cdot \Delta M} \quad [22]$$

Utilizando como isótopo de referencia el isótopo 52 del cromo, se obtiene para un isótopo  $i$  de cromo:

$$R_{\text{teórica}} = \frac{\text{Abundancia teórica Cr-52}}{\text{Abundancia teórica Cr-i}} (\text{valor tabulado}) \quad [23]$$

$$R_{\text{experimental}} = \frac{\text{Abundancia experimental Cr-52}}{\text{Abundancia experimental Cr-i}} \quad [24]$$

$$\Delta M = i - 52 \text{ (diferencia de masa)} \quad [25]$$

La abundancia se calcula como:

$A^i = \frac{R}{\sum_{i=1}^n R^i}$ , siendo  $R$  la relación entre la intensidad de cada isótopo y el isótopo más abundante, en este caso, el isótopo de mayor abundancia natural es el  $^{52}\text{Cr}$ . Las intensidades se obtienen con la integración de los picos cromatográficos, de Cr (III) o de Cr (VI) tras extraer la relación  $m/z$  de interés.

#### Cálculo de las abundancias isotópicas en los trazadores

Una vez obtenido el factor de discriminación de masa se corrigen las relaciones isotópicas mediante la ecuación [26] y se obtienen las abundancias en el trazador enriquecido isotópicamente mediante la ecuación [27]:

$$R_{\text{corregida}} = \frac{R_{\text{experimental}}}{1+K\Delta M} \quad [26]$$

$$A_{\text{spike}}^i = \frac{R_{\text{corregida}}^i}{\sum_{i=1}^n R_{\text{corregida}}^i} \quad [27]$$

#### Cálculo de la concentración de los *spikes* por IDA inversa

La ecuación de la dilución isotópica inversa es una adaptación de la ecuación general de la dilución isotópica convencional (ecuación [1]):

$$C_t = C_{\text{nat}} \frac{m_{\text{nat}}}{m_t} \frac{M_t}{M_{\text{nat}}} \frac{A_{\text{nat}}^a}{A_t^b} \left( \frac{R_m - R_{\text{nat}}}{1 - R_m R_t} \right) \quad [27]$$

Siendo en este caso:

$C_t$  y  $C_{\text{nat}}$ , las concentraciones de cromo en el trazador enriquecido isotópicamente y en el patrón natural.

$m_{\text{nat}}$  y  $m_t$ , los pesos del estándar natural y del trazador en la mezcla.

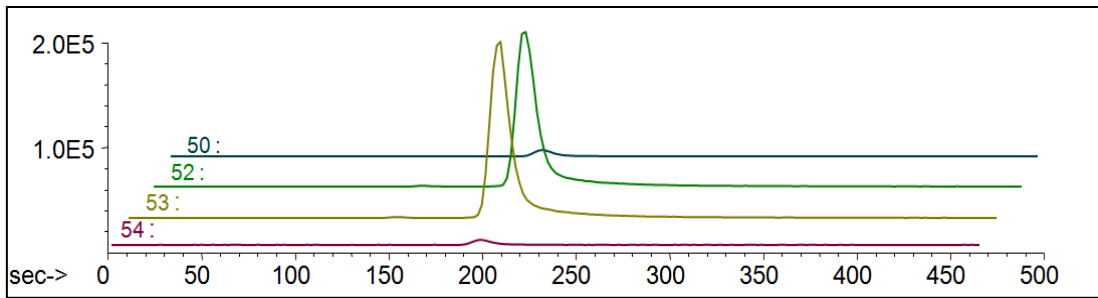
$M_t$  y  $M_{\text{nat}}$ , los pesos atómicos elementales del trazador y del patrón natural.

$A_{\text{nat}}^a$ , la abundancia natural del isótopo más abundante de cromo, m/z 52 (83,7895) valor tabulado por la IUPAC.

$A_t^b$ , la abundancia del isótopo más abundante de la disolución a caracterizar. Se utiliza el isótopo en el que está enriquecido el trazador enriquecido isotópicamente: el 50 para el Cr(VI) y 53 para el Cr(III).

#### **4.2.1. Caracterización de la disolución de $^{53}\text{Cr}$ (III)**

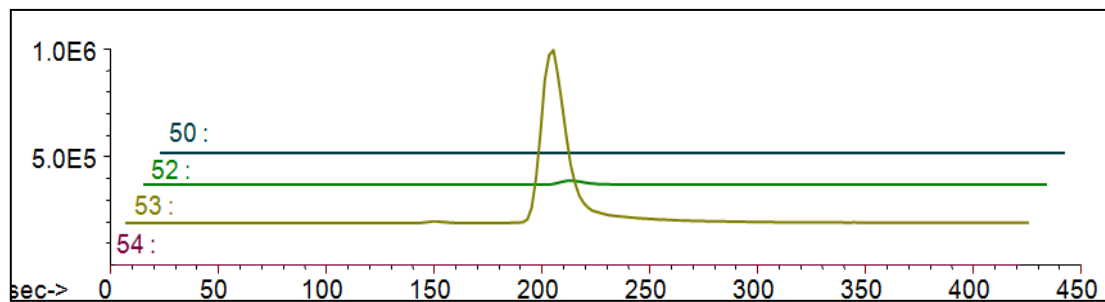
Se determinó la concentración de dicha disolución de Cr(III) enriquecido en el isótopo 53 mediante IDMS inversa realizando tres mezclas de un patrón de abundancia natural con la disolución de trazador enriquecido. Cada replica se introdujo tres veces en el equipo de IC-ICPMS y se obtuvieron los cromatogramas correspondientes, en la imagen inferior se muestra uno de ellos.



**Figura 7.** Cromatograma IC-ICPMS del trazador isotópico de Cr(III) enriquecido en el isótopo 53 al que se le añadió una cantidad equivalente de Cr(III) de abundancia isotópica natural.

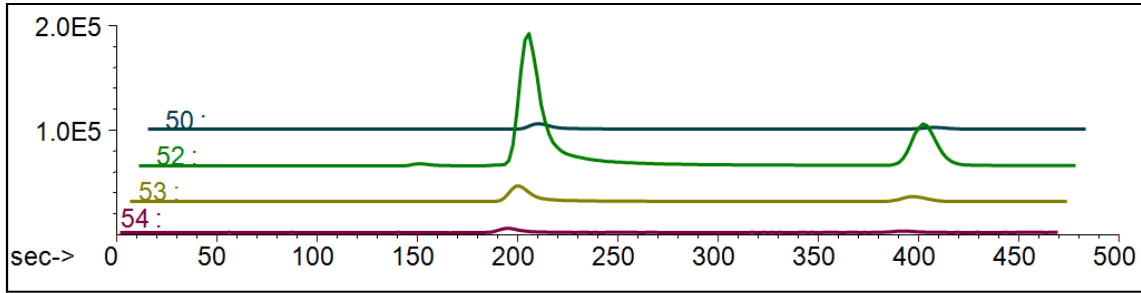
Como se indicó en el apartado 3.3.1. las disoluciones se realizan añadiendo el patrón natural de Cr(III) y el enriquecido en la misma proporción, en la Figura 7 se puede observar que solo aparecen un pico cromatografico al tiempo de retención al que según la bibliografía consultada sale el compuesto de Cr(III) complejoado con EDTA. Los picos más intensos son los correspondientes al isótopo 53 del trazador y al 52 que es el mayoritario en la naturaleza.

Para el cálculo de las abundancias isotópicas del trazador se mide en el sistema IC-ICP-MS una disolución del mismo de concentración aproximada de 100ppb. La Figura 8 muestra un Cromatograma en el que se observa como aparece un pico muy intenso correspondiente al  $^{53}\text{Cr}$  (III) y como los picos de los otros isótopos están en muy baja abundancia en la disolución de trazador. Esta determinación también se realizó por triplicado.



**Figura 8.** Cromatograma IC-ICPMS obtenido para el cálculo de abundancias del trazador de Cr(III) enriquecido en el isótopo 53.

Como se explicó en el apartado anterior para la corrección de la discriminación de masas se analizó una disolución de Cr(III) y Cr(VI) de abundancias isotópicas naturales con el que se calculó el factor de corrección de la discriminación de masa. Esta disolución se inyecta en el equipo cada tres medidas durante todo el proceso, tanto en la caracterización de los trazadores isotópicos como en la medida de las muestras. La Figura 9 corresponde a un cromatograma de la disolución de patrones de abundancia isotópica natural utilizada en la corrección de la discriminación de masas.



**Figura 9.** Cromatograma IC-ICPMS de una disolución de Cr(VI) y Cr(III) de abundancias isotópicas naturales utilizada para la corrección de la discriminación de masa en análisis de las muestras.

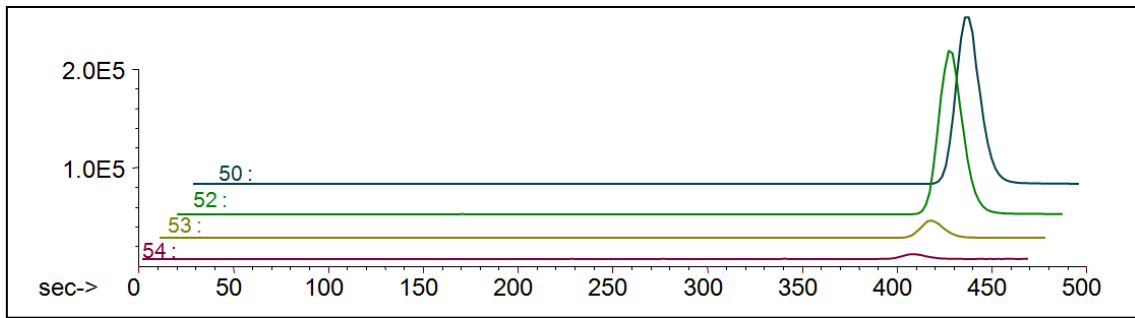
Como se puede observar en la imagen superior en este caso las señales más intensas corresponden a la relación  $m/z$  52, que es la masa del isótopo mayoritario del cromo natural. Los resultados de abundancias y concentración obtenidos en la caracterización del trazador de Cr (III) marcado en el isótopo 53 se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Composición isotópica y concentración obtenida mediante dilución isotópica inversa de la disolución de  $^{53}\text{Cr}$  (III).

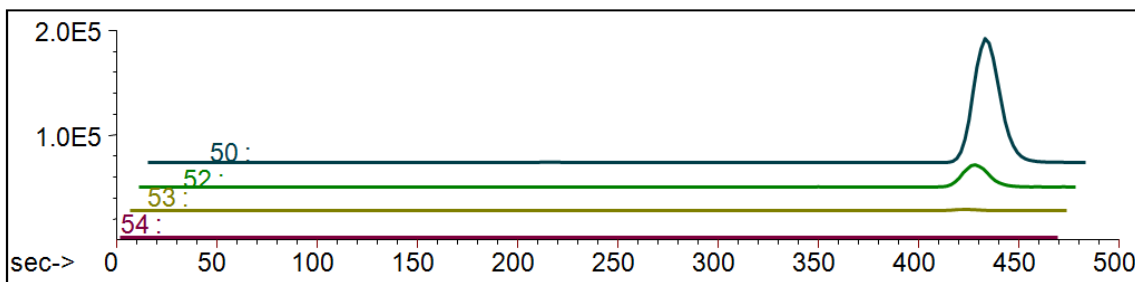
Isótopo	Abundancia media	SD	RSD (%)
50	0,022	0,005	23,0
52	2,149	0,038	1,8
53	97,676	0,040	0,0
54	0,153	0,057	37,5
Cr(III) $\mu\text{g g}^{-1}$	1111,9	6,9	0,6

#### 4.2.2. Caracterización del trazador de $^{50}\text{Cr}$ (VI)

Se procedió del mismo modo que en el caso anterior para el cálculo de la concentración de la disolución de Cr (VI) enriquecido en el isótopo 50. La Figura 10 muestra un cromatograma correspondiente al trazador isotópico mezclado con el patrón de abundancia isotópica natural mientras que la Figura 10 muestra un cromatograma correspondiente a la medida de abundancias isotópicas del trazador.



**Figura 10.** Cromatograma IC-ICPMS obtenido en un análisis por dilución isotópica inversa del trazador  $^{50}\text{Cr(VI)}$ .



**Figura 11.** Cromatograma IC-ICPMS correspondiente al cálculo de las abundancias del trazador de Cr(VI) marcado en el isótopo 50.

En la Figura 10 y Figura 11 se puede ver que la disolución no está contaminada con ninguna otra especie de cromo y que las abundancias isotópicas se encuentran en la proporción adecuada. Los resultados del cálculo de abundancias isotópicas y la concentración de la disolución aparecen en la tabla siguiente.

**Tabla 5.** Abundancias isotópicas y concentración de la disolución de  $^{50}\text{Cr(VI)}$  empleada en este trabajo.

Isótopo	Abundancia media	SD	RSD (%)
50	86,049	0,116	0,134
52	13,335	0,087	0,654
53	0,547	0,014	2,599
54	0,152	0,017	11,432
<hr/>			
Cr(VI) $\mu\text{g g}^{-1}$	126,00	1,47	1,16

### 4.3. Estudio del comportamiento del Cr (III) y Cr (VI) durante la simulación de digestión gástrica propuesta en la normativa UNE-EN 71-3:2013.

#### 4.3.1. Experimentos realizados en ausencia de matriz

Como se explico en el procedimiento (apartado 3.3.2.) se evaluó el comportamiento de las especies trivalente y hexavalente de cromo en la migración de cuatro muestras de material de juguete, clasificadas en la categoría III por la normativa UNE-EN 71-3:2013. Siguiendo el esquema de la Figura de la parte experimental, se realizaron adiciones de patrones naturales de cada analito a las disoluciones de las muestras reales y a blancos. Una vez realizada la incubación con ácido clorhídrico, dos horas a  $(37 \pm 2)^\circ\text{C}$  (una hora en agitación y otra en reposo) que simula una digestión gástrica se procedió al estudio de las recuperaciones de las especies de Cr previamente añadidas.

Para el cálculo de las concentraciones de las especies de cromo por dilución isotópica con espectrometría de masas se añadieron los trazadores caracterizados en la primera parte del trabajo a las disoluciones de migración como se describe en la Figura 6 de la sección 3.3.2. de la sección Experimental. Para ello, se realizaron varias réplicas de cada muestra y se analizaron mediante IC-ICPMS.

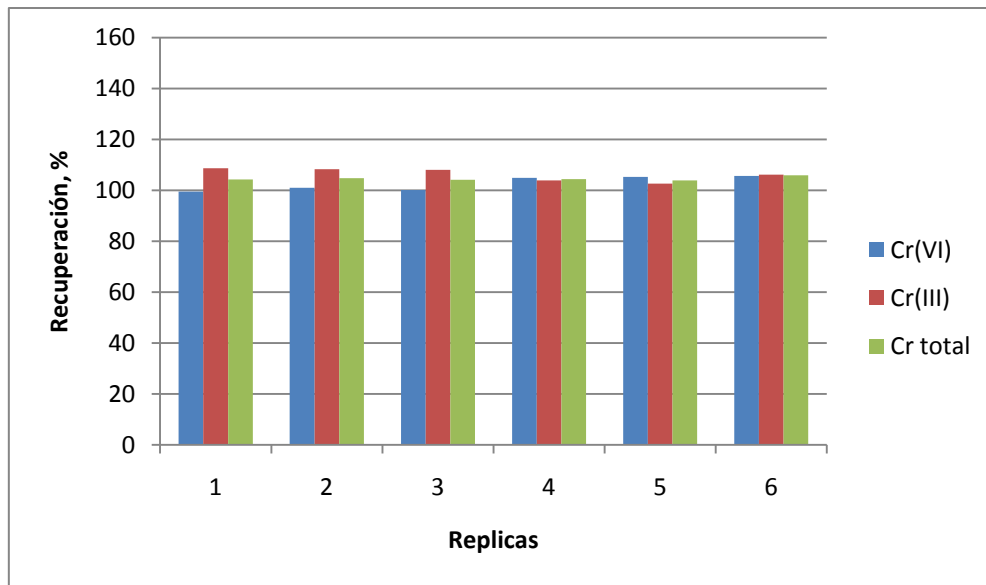
Obtenidos los cromatogramas correspondientes se integran los picos de Cr (III) y Cr(VI) para hallar sus áreas y utilizarlas para el cálculo de las fracciones molares del elemento natural y enriquecido en cada muestra mediante la aplicación de la deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) cuyo desarrollo se explica en el apartado 4.1. A partir de las fracciones molares se determinó la concentración de las especies de cromo en las muestras.

Para cada especie de Cr, se calculó la recuperación de cromo como el porcentaje de la especie de Cr determinada experimentalmente entre la concentración inicial (teórica) de los patrones naturales de cromo añadidos.

$$\text{Recuperación}(\%) = \frac{[\text{Cr}]_{\text{experimental}}}{[\text{Cr}]_{\text{teorica}}} \times 100$$

En la gráfica siguiente se presenta las recuperaciones de Cr (III), Cr (VI) y Cr total correspondientes a disoluciones de migración en ausencia de matriz a las que se aplicó el mismo procedimiento que posteriormente se aplica a las muestras reales. Se realizaron seis réplicas equivalentes sin matriz de muestra.

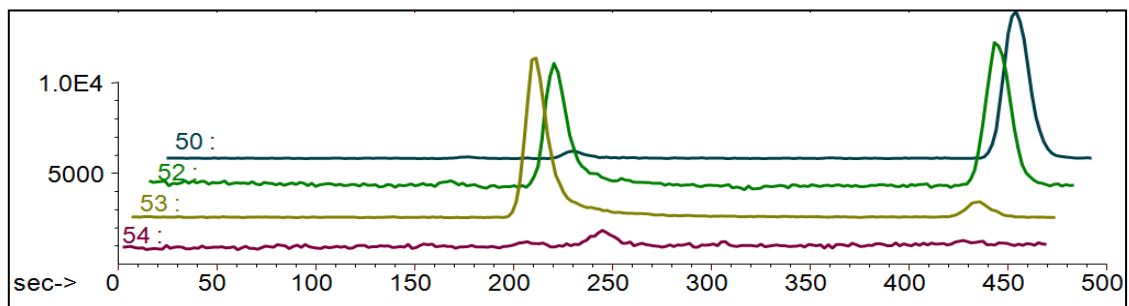




**Figura 12.** Gráfica de las recuperaciones obtenidas en disoluciones de migración en ausencia de matriz en las que se añadió una cantidad conocida de Cr (VI) y Cr (III) de abundancia natural.

Se puede observar en la Figura 2 que se obtuvieron unas recuperaciones cuantitativas para el Cr(III) y Cr(VI), lo que demuestra que durante la etapa de migración no se producen transformaciones entre las especies de cromo. Además se puede asegurar que la adición de las especies enriquecidas tras la etapa de migración permite cuantificar cuantitativamente las especies de cromo naturales que se añadieron al principio del proceso de migración.

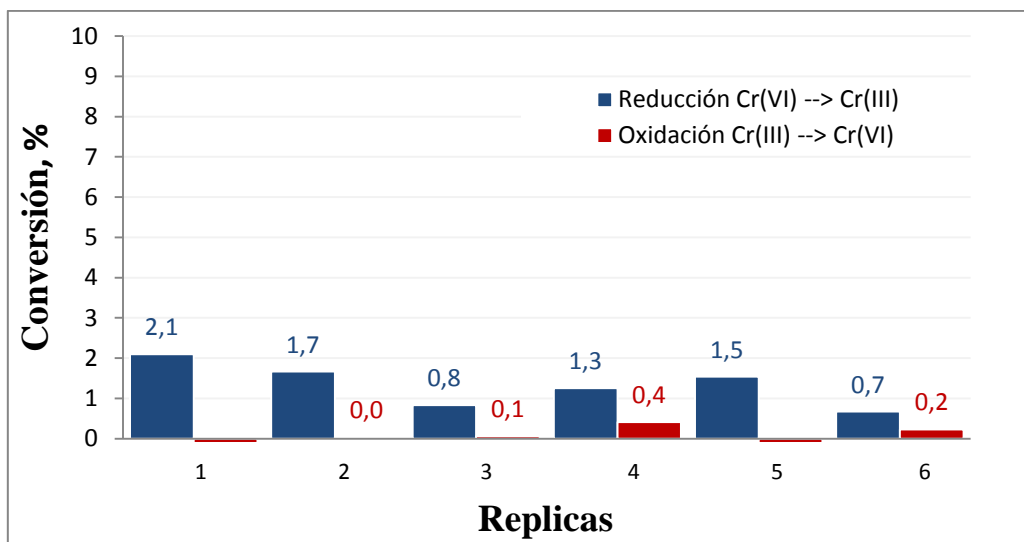
La Figura 23 muestra uno de los cromatogramas obtenidos para una las disoluciones de migración en ausencia de matriz. El compuesto de Cr(III)-EDTA eluye a un tiempo de 200s y el cromo hexavalente alrededor de los 400s. A  $m/z = 54$  se distingue la interferencia isobárica del hierro que sale poco después del cromo trivalente, pero no afecta en la integración del pico de Cr(III).



**Figura 23.** Cromatograma IC-ICPMS de una disolución de migración en ausencia de matriz a la que se añadió Cr(III) y Cr(VI) de abundancia isotópica natural antes de la migración y trazadores isotópicos  $^{53}\text{Cr}$ (III) y  $^{50}\text{Cr}$ (VI) tras la etapa de migración.

La determinación mediante la metodología aplicada en este trabajo, descrita recientemente por Fabregat-Cabello y colaboradores (21), solo requiere una etapa de complejación a 80°, para garantizar que todo el Cr (III) presente en la disolución se compleje con el EDTA y poder realizar la separación cromatográfica de las dos especies de cromo correctamente. Sin embargo, como queda demostrado en la publicación previamente señalada, el proceso realizado en un sistema de microondas focalizadas puede inducir conversiones en los analitos, las cuales son corregidas mediante dilución isotópica empleando un trazador isotópico doble.

En la Figura 23 se pueden distinguir los picos correspondientes a estas conversiones; a  $m/z=50$  se ve el pico del  $^{50}\text{Cr}$  (VI) pero también a esta relación masa-carga se observa un pequeño pico al tiempo de retención al que sale el compuesto de Cr (III). De forma equivalente ocurre con la señal del trazador de  $^{53}\text{Cr}$  (III). Se sabe que se deben a interconversiones entre especies ya que al caracterizar las disoluciones enriquecidas (apartado 4.2) se comprobó que las disoluciones de los trazadores no estaban contaminadas. Las conversiones observadas se muestran en la Figura 14. Es importante señalar que estas interconversiones entre el cromo trivalente y hexavalente sólo pueden ser determinadas una vez añadidos los trazadores isotópicos. Cualquier, conversión que haya ocurrido durante la migración se calcularía teniendo en cuenta los valores de recuperación de los patrones naturales.



**Figura 34.** Porcentaje de conversiones obtenido tras el proceso de complejación en microondas en la determinación de la concentración de especies de Cr naturales en disoluciones de migración en ausencia de matriz.

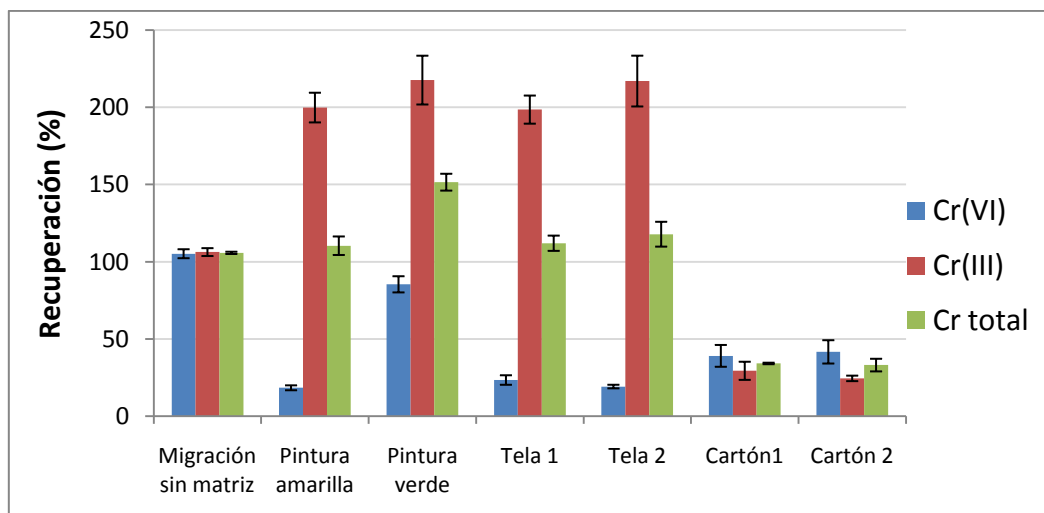
Como se puede observar en la Figura 14, en todas las replicas realizadas en este ensayo la conversión está por debajo del 3% para el caso de la reducción y es menor del 0,5% para la oxidación, por lo tanto se pueden considerar mínimas y prácticamente despreciables.

#### 4.3.2. Experimentos realizados con muestras reales

A continuación se muestran los resultados conseguidos en la aplicación de la metodología a las muestras reales. Se llevo a cabo el proceso de simulación gástrica con cuatro matrices diferentes catalogadas dentro de la categoría III según la normativa de seguridad en los juguetes:

- Matriz 1: Recubrimiento, pintura amarilla.
- Matriz 2: Recubrimiento, pintura verde.
- Matriz 3: Textil, tela de un vestido de una muñeca. (Se hicieron dos replicas)
- Matriz 4: Papel o cartón, cartas de una baraja infantil. (Dos réplicas)

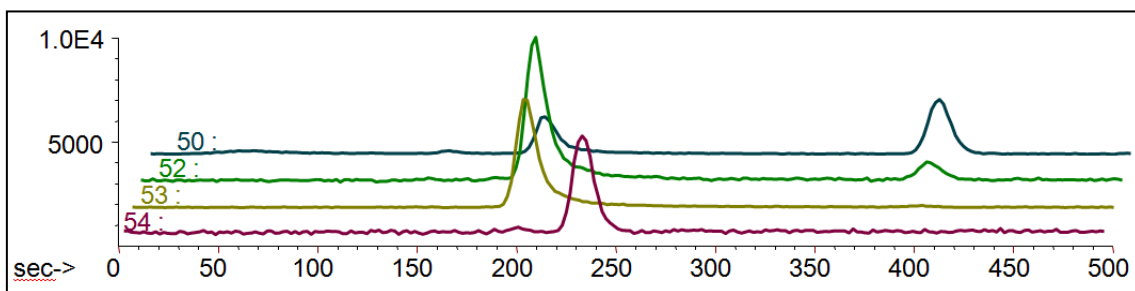
Para evaluar la influencia de la matriz sobre la recuperación se añadieron a las muestra la mismas cantidad de los patrones de Cr (III) y Cr (VI) de abundancias naturales de modo que se obtuviese una concentración de 100 ppb. Se repitió la misma estrategia que se utilizó en las disoluciones de migración en ausencia de matriz. La Figura 45 muestra las recuperaciones obtenidas en los distintos tipos de muestra analizados y se comparan con las obtenidas en ausencia de matriz en la sección anterior.



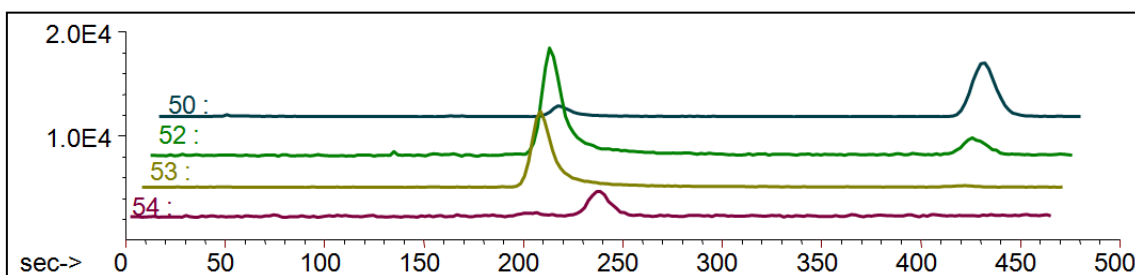
**Figura 45.** Recuperaciones obtenidas para las adiciones iniciales de Cr(VI) y Cr(III) de abundancia natural sobre las muestras reales objeto de estudio y comparación con la recuperación promedio de las disoluciones sin matriz de muestra.

Como se puede observar en la Figura 45 las recuperaciones para los análisis de las muestras con el material de juguete son diferentes a las obtenidas en ausencia de matriz. En el caso del material de recubrimiento, se emplearon dos pinturas diferentes, amarilla y verde, debido a que los pigmentos de estos colores suelen estar compuestos por óxidos de cromo (23). En ambos casos el cromo hexavalente recuperado en la disolución de migración es menor del añadido inicialmente, mientras que el Cr (III) presenta una recuperación superior al 200%.

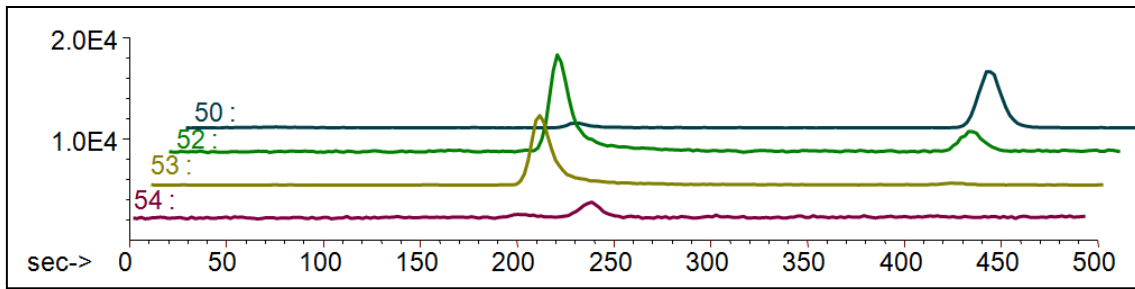
Para los dos colores la cantidad de Cr (VI) recuperada es menor lo que indica una importante reducción a Cr (III) durante el proceso de migración por ello la concentración de cromo trivalente obtenida es mayor. Para la pintura amarilla la recuperación de cromo total se mantiene próxima al 100% y en la verde es superior al 150%. Se podría suponer que ese exceso en el contenido total de cromo es contribución de la muestra. Un resultado similar se observa para la tela aunque en ambas telas el contenido de Cr parece inferior al de la pintura 2. Las Figura 5, Figura 6 y Figura 7 muestran un cromatograma IC-ICP-MS de cada una de las muestras de pintura y de tela.



**Figura 56.** Cromatograma IC-ICP-MS correspondiente al análisis de la disolución de migración del recubrimiento de pintura amarilla.

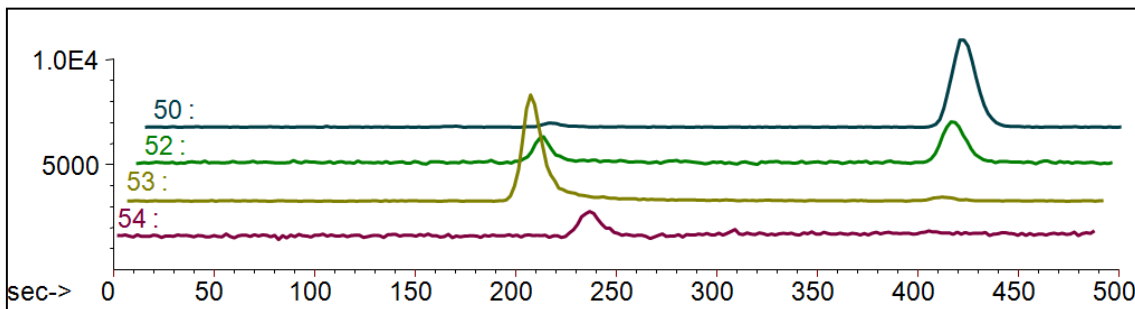


**Figura 67.** Cromatograma IC-ICP-MS del análisis de la disolución de migración de la muestra de pintura verde.



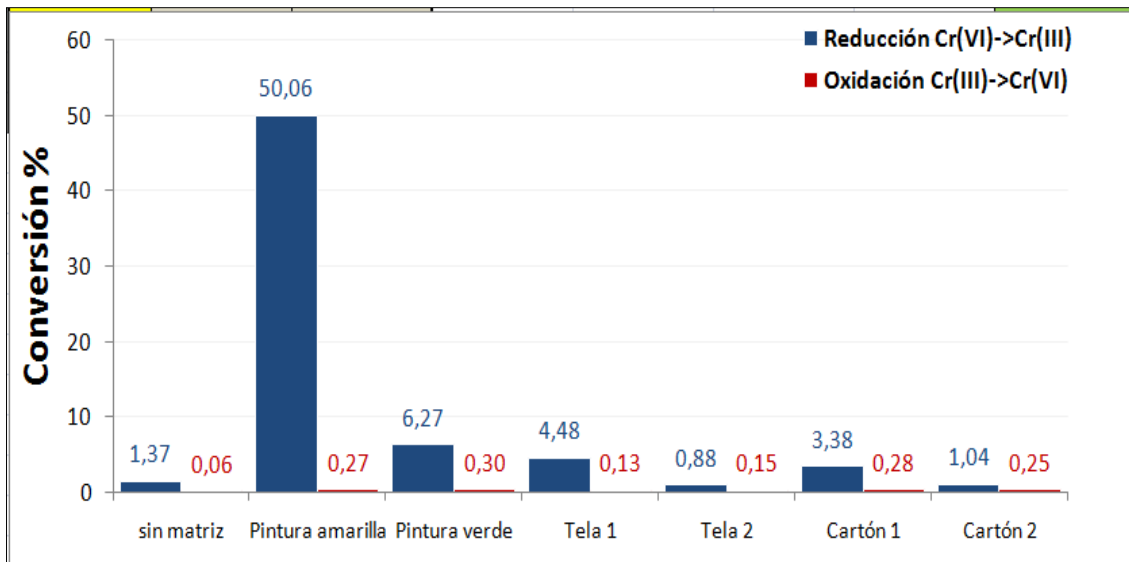
**Figura 78.** . Cromatograma IC-ICP-MS obtenido en el análisis de la disolución de migración proveniente de la tela.

En el caso del cartón la recuperación del contenido total en cromo es muy inferior al 100% (en torno al 30%). Este hecho podría deberse a que durante el proceso de migración el material forma una especie de pasta que podría estar causando la retención de estos compuestos en el interior de esa matriz en lugar de liberarse a la disolución. En la Figura 89 se puede observar que el isótopo de cromo 52, que es el isótopo de mayor abundancia natural, aparece en mucha menor medida que en los análisis anteriores, en cambio los picos de los isótopos 50 y 53 correspondientes a los trazadores isotópicos presentan intensidades mucho mayores.



**Figura 89.** Cromatograma IC-ICPMS del análisis de la disolución de migración proveniente de la muestra de cartón (carta).

La Figura 20 muestra el porcentaje de interconversión de las especies de Cr a lo largo de la preparación analítica de la muestra tras la etapa de migración. Se observa que en presencia de la matriz sólida de los juguetes la reducción de Cr (VI) a Cr (III) se incrementa tras la etapa de complejación en microondas (hay que recordar que las conversiones sólo se pueden determinar una vez añadidos los trazadores). La oxidación sigue siendo baja para todas las matrices pero las mayores reducciones se detectan para el caso de la pintura, sobretudo en la verde que llega a tener un 50% de conversión durante el procedimiento de complejación. Esto puede deberse a una mayor presencia de materia orgánica ya que en presencia de materia orgánica el cromo hexavalente se reduce con más facilidad. Las pinturas eran el recubrimiento de un puzle de madera y en el proceso de toma de muestra ésta pudo mezclarse con la pintura.



**Figura 20.** Conversiones obtenidas tras el proceso de complejación en microondas de las disoluciones de migración obtenidas tras la digestión gástrica de las muestras. Comparación con el promedio de las disoluciones en blanco.

## **V. Conclusiones**

---

A partir de los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Máster se puede concluir:

- Se consiguió caracterizar y cuantificar los trazadores de  $^{50}\text{Cr}$  (VI) y  $^{53}\text{Cr}$ (III) de cromo mediante dilución isotópica inversa empleando disoluciones patrón de Cr (III) y Cr(VI) de abundancias isotópicas naturales.
- En el estudio del comportamiento del Cr(III) y Cr(VI) durante la simulación de digestión gástrica propuesta en la normativa UNE-EN 71-3:2013 en ausencia de matriz se obtuvieron recuperaciones cuantitativas para las dos especies lo que demostró que durante la etapa de migración no se producen transformaciones entre las especies de cromo. Además se demuestra que la adición de las especies enriquecidas tras la etapa de migración permite cuantificar cuantitativamente las especies de cromo naturales.
- En el estudio del comportamiento del Cr (III) y Cr (VI) durante la simulación de digestión gástrica propuesta en la normativa UNE-EN 71-3:2013 en presencia de distintas matrices de juguetes se puede concluir que el proceso de migración detallado en la norma produce una importante reducción de Cr(VI) especialmente cuando se analizaron pinturas y telas. En el caso del cartón no se consiguieron buenas recuperaciones debido a una posible adsorción de las especies de Cr en la matriz sólida.

Por otro lado, las conclusiones de aprendizaje derivadas de la realización del presente Proyecto Fin de Máster se resumen a continuación:

- Se han llevado a cabo búsquedas bibliográficas en bases de datos científicas y se ha aprendido a ser capaz de gestionar adecuadamente la información obtenida, mejorando así la capacidad de análisis y síntesis.
- Se ha mejorado la capacidad para el trabajo en grupo ya que este trabajo se ha realizado con la ayuda de varios miembros del Grupo de Investigación de Isótopos Estables de la Universidad de Oviedo.
- Se ha desarrollado la capacidad de tomar decisiones en función de los resultados obtenidos en el laboratorio particularmente del acoplamiento de la Cromatografía de Líquidos acoplada al ICP-MS, lo que ha servido para conseguir una familiarización más avanzada con la técnica analítica empleada y utilizarla para resolver problemas analíticos.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**

---

1. **Lois, M. E., Armhein, C., Frankenberger W. T. Jr.** 1994, Rev. Environ. Contam. T., Vol. 136, págs. 91-121.
2. **Lenntech BV.** [En línea] [www.lenntech.es](http://www.lenntech.es).
3. **Stwerka, A.** *A Guide to the Elements*, s.l. : Oxford University Press.
4. **Wilkinson, F.A. Cotton y G.** *Química Inorgánica Avanzada*, s.l.: Limusa ,1996.
5. **Burriel Martí, F., Lucena Conde, F., Arribas Jimeno, S., Hernandez Méndez, J.** *Química Analítica Cualitativa*. s.l. : Paraninfo, 1994.
6. *Occupational exposure to hexavalent chromium. OSHA, Occupational Safety and Health Administration.*[ed.] Department of Labor. 2006. Vol. 71, págs. 10099-10385.
7. **ATSDR y Salud, División de Toxicología y Ciencias de la.** [www.atsdr.cdc.gov/es](http://www.atsdr.cdc.gov/es). [En línea] Septiembre de 2012.
8. **Baran, E. J.** *Química Bioinorgánica*. s.l. : Mc Graw Hill, 1995.
9. **Boffetta, P.** *Carcinogenicity of trace elements with reference to evaluations made by the International Agency for Research on Cancer*. 1993, Scan J Work Environ Health, Vol. 19, págs. 97-70.
10. **E. Mencías Rodríguez, L. M. Mayero Franco.** *Manual de Toxicología Básico*. 2000. págs. 631-632.
11. **M. A. Babich, K. M. Hatlelid, S. C. Wanna-Nakamura.** *Toy Safety and Hazards*. Tercera. s.l. : Elsevier, 2014. págs. 791-792.
12. *Safety of Toys. Part 3: Migration of certain elements*. International Organization for Standardization. Switzerland : s.n., 2010. ISO 8124-3.
13. **C. del Cacho, A. Cerdà, V. Cerdà, J.M. Estela, J.I. García-Alonso, M. Hernandez-Córdoba, R. Izquierdo, M. Pena, L. Ramos, P. Rodríguez, C. Ubide.** *Análisis químico de trazas*. Síntesis S.A., 2011. págs. 224-281.
14. **K. Heumann,** *Isotope dilution mass spectrometry of inorganic and organic substances*. G. 1986, Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie, Vol. 325, págs. 661-666.
15. **P. Rodríguez-González, J.M. Marchante-Gayón, J.I. García-Alonso, A. Sanz-Medel.** *Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review..* 2005, Spectroch. Act., Vol. 60, págs. 151-207.
16. **A. P. De Leenheer, L.M. Thienpont.** *Applications of isotope dilution-mass spectrometry in clinical chemistry, pharmacokinetics, and toxicology*. 11, 1992, Mass Spectrom. Rev., págs. 249-307.
17. **J. Heilmann, K.G. Heumann.** *Development of a species-unespecific isotope dilution GC-ICPMS. Method for possible routine quantification of sulfur species in petroleum products..* 2008, Anal. Chem., Vol. 80, pág. 1952.

18. **R. Tófalvi, A. Sepsey, K. Horvath, P. Hajós.** *Environmental significance and identification of metal-chelate complexes using ion chromatography.* 1, 2011, Hung. J. Ind. Chem., Veszprém, Vol. 39, págs. 95-99.
19. **L. Hinojosa Reyes, J.M. Marchante Gayón, J.I. García Alonso.** *Determination of selenium in biological materials by isotope dilution analysis with an octapole reaction system ICP-MS.* 2003, Anal. At. Spectrom., Vol. 18, págs. 11-16.
20. **Heumann, K.G.** *Metal speciation in the environment.* s.l. : Springer-Verlag, 1990.
21. **N. Fabregat-Cabello, P. Rodríguez-Gonzalez, 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.* 2012, Environ. Sci. Techno., Vol. 46, págs. 12542-12549.
22. **J.I. García Alonso, M. Moldovan, J.A. Castrillon, I. Caramés.** *Método para el marcaje e identificación de objetos manufacturados, sustancias y organismos, y sus usos.* WO 2010092202 A1 España, 19 de Agosto de 2010. Solicitud PCT/ES2010/000053.
23. **Doerner, M.** *Los materiales de pintura y su empleo en el arte.* sexta. Barcelona : Reverté, 2005. págs. 52,73.