



Universidad de Oviedo

**MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS**

**Trabajo Fin de Máster**

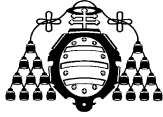
**Determinación de especies de mercurio en materiales  
biológicos mediante análisis por dilución isotópica con  
trazadores múltiples**

**ADRIANA LEA SÁNCHEZ**

**Julio 2015, Oviedo**

## Índice

1. Introducción.....	2
1.1 El mercurio.....	2
1.2 Ciclo biogeoquímico del mercurio.....	3
1.3 Toxicidad del mercurio.....	4
1.4 Legislación del mercurio.....	6
1.5 Análisis de especiación del mercurio.....	6
1.5.1 Métodos de extracción asistidos por microondas para el análisis de especiación de mercurio en muestras biológicas.....	7
1.5.2 Técnicas de separación cromatográfica para realizar el análisis de especiación de Hg.....	7
1.5.3 Técnicas de detección para el análisis de especiación de Hg.....	8
1.6 Análisis por dilución isotópica.....	9
1.7 La dilución isotópica en análisis de especiación.....	10
2. Objetivo.....	13
3. Procedimiento experimental.....	14
3.1 Instrumentación.....	14
3.2 Reactivos y materiales.....	14
3.3 Procedimientos.....	15
3.3.1 Determinación del porcentaje de humedad.....	15
3.3.2 Extracción sólido-líquido de las muestras.....	16
3.3.3 Propilación, separación y determinación de las especies por GC-ICP-MS y GC-MS/MS.....	17
3.3.4 Medida de relaciones isotópicas mediante GC-ICP-MS.....	17
3.3.5 Medida de relaciones isotópicas mediante GC-MS/MS.....	18
3.3.6 Ecuaciones matemáticas para la determinación de metilmercurio, etilmercurio y Hg(II) mediante dilución utilizando un trazador triple.....	21
4. Resultados y discusión.....	25
4.1 Optimización del volumen de disolución derivatizante NaBPr <sub>4</sub> .....	25
4.2 Optimización del tiempo de integración en GC-ICP-MS.....	26
4.3 Optimización de la energía de colisión en GC-MS/MS.....	28
4.4 Determinación del porcentaje de humedad.....	31
4.5 Análisis de Materiales de Referencia Certificados.....	31
4.5.1 Análisis del material DOLT-4 (Hígado de pez perro).....	31
4.5.2 Análisis del material IAEA-086 (Pelo humano).....	34
4.5.3 Análisis del material IAEA-085 (Pelo humano).....	37
4.5.4 Análisis del material SRM 955c (Sangre de cabra).....	39
5. Conclusiones.....	45
6. Bibliografía.....	46



Pablo Rodríguez González, Investigador Ramón y Cajal del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

**CERTIFICA:**

Que el presente Trabajo, titulado “Determinación de especies de mercurio en materiales biológicos mediante análisis por dilución isotópica con trazadores múltiples”

ha sido realizado por la alumna Adriana Lea Sánchez bajo mi dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2014-15, y cuya presentación autorizo.

Oviedo, 15 de Julio de 2015

Fdo: Pablo Rodríguez González

## INTRODUCCIÓN

## 1. Introducción

### 1.1 El Mercurio

El mercurio (Hg) es un metal pesado de masa atómica 200.59. A temperatura ambiente su forma elemental se encuentra en estado líquido (**Figura 1**). Es buen conductor de la electricidad pero no del calor.



**Figura 1.** Mercurio elemental.

Las fuentes del mercurio en el medio ambiente pueden ser antropogénicas y naturales. Las actividades antropogénicas que liberan mercurio al medio ambiente se pueden clasificar a su vez en tres categorías:

- **Procesos industriales que utilizan mercurio para llevar a cabo alguna de sus etapas.** El mercurio es utilizado en plantas de cloro-álcali, en minería de oro a pequeña escala, empastes dentales, lámparas fluorescentes, manómetros o relojes entre otros. También se produce mercurio como catalizador o reactivo en laboratorios académicos, industriales u hospitalarios, así como en la agricultura como fungicida.
- **Actividades que provocan la movilización de mercurio proveniente de fósiles u otros minerales.** La extracción de petróleo, quema de carbón o procesos de incineración representan la fuente principal de emisión de mercurio a la atmósfera representando el 70% del total de las emisiones.
- **Movilización del mercurio emitido por fuentes antropogénicas antiguas.** La erosión producida por el viento, la lluvia y los procesos de lixiviación contribuyen al transporte de mercurio desde las superficies terrestres a ríos, lagos y océanos.

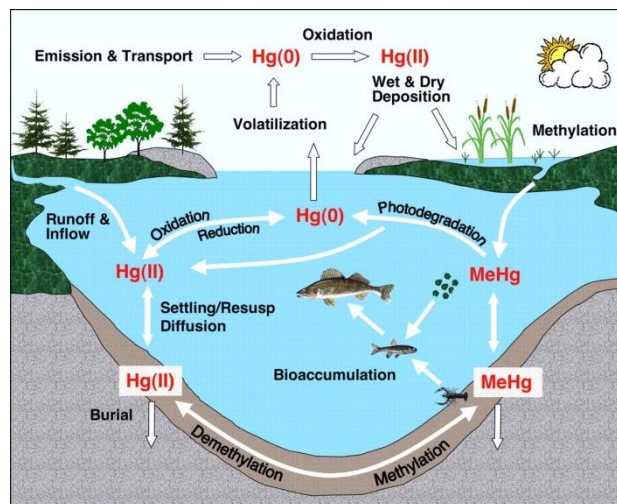
Las fuentes naturales de mercurio son numerosas y, en ocasiones, liberan una cantidad de Hg mayor que la producida por la mano del hombre. La fuente natural más significativa son los

## Introducción

volcanes. También contribuyen los respiraderos geotérmicos, la degradación de minerales o los incendios forestales. Los depósitos de mercurio son habituales en la tierra donde se encuentra como sulfuro de Hg o cinabrio ( $\text{HgS}$ ). [1]

### 1.2 Ciclo biogeoquímico del mercurio

El mercurio se puede encontrar en el medio ambiente en distintas formas químicas como por ejemplo el mercurio elemental ( $\text{Hg}^0$ ) o el mercurio inorgánico ( $\text{Hg}^{+2}$ ), y formando parte de compuestos orgánicos como el metilmercurio, etilmercurio o fenilmercurio. Cada una de las diferentes formas presenta diferentes propiedades fisicoquímicas y una diferente toxicidad. El ciclo biogeoquímico del mercurio está dominado por varios procesos. Entre ellos los más importantes son los de evaporación de Hg elemental a la atmósfera, su deposición como Hg (II) y las reacciones de metilación/desmetilación en el medio ambiente marino. Todos estos procesos en conjunto constituyen el ciclo biogeoquímico del mercurio como se muestra en la **Figura 2**. [2]



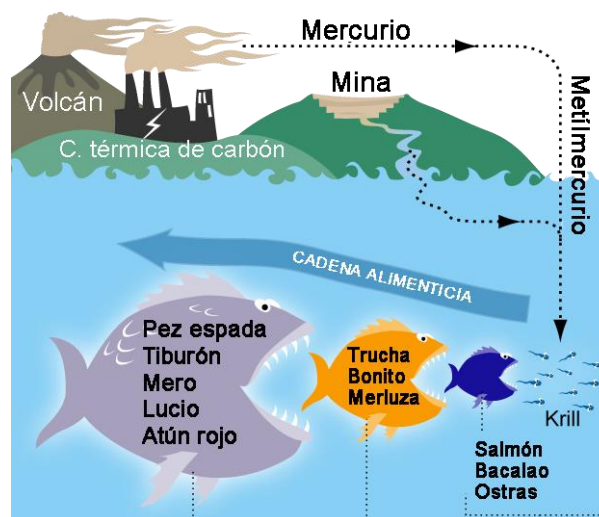
**Figura 2.** Ciclo biogeoquímico del mercurio. [3]

Una vez que el mercurio ha entrado en ciclo biogeoquímico es capaz de mantenerse en él indefinidamente. Puede ser transportado durante miles de kilómetros a través de la atmósfera, al principio como mercurio elemental gaseoso ( $\text{Hg}^0$ ), posteriormente se oxida a mercurio gaseoso reactivo ( $\text{Hg}^{+2}$ ), y finalmente se deposita a través de la lluvia. Debido a estos procesos de transporte el mercurio puede depositarse muy lejos del foco de emisión, por lo que es considerado un contaminante global. Una vez depositado en medios acuáticos, existen numerosos tipos de bacterias que son capaces de convertir el Hg (II) en metilmercurio en un proceso denominado metilación que ocurre en la interfase agua-sedimento. El metilmercurio es un compuesto altamente tóxico ya que es capaz de bioacumularse en los organismos marinos y biomagnificarse a lo largo de la cadena alimenticia. Por esta razón algunas especies

depredadoras [4] de pescado como el atún o el pez espada pueden alcanzar niveles de metilmercurio potencialmente tóxicos para el ser humano. Además de los procesos de metilación también ocurren reacciones bióticas y abióticas que reducen el mercurio nuevamente a  $Hg^0$  haciendo que regrese a la atmósfera por volatilización. [3] El mercurio únicamente abandona el ciclo cuando se transforma en  $HgS$ , ya que es insoluble y precipita en los sedimentos marinos.

### 1.3 Toxicidad del mercurio

Debido a la movilidad del mercurio y su alta capacidad de bioacumulación en las diferentes especies marinas, el consumo de pescado constituye la principal fuente de exposición de los seres humanos al mercurio. Como se ha comentado anteriormente, las especies que concentran una mayor cantidad de mercurio son las depredadoras (**Figura 3**), siendo además las más consumidas por el ser humano. Este proceso de acumulación entre especies se denomina biomagnificación.



**Figura 3.** Esquema del proceso de biomagnificación que sufre el mercurio en la cadena alimentaria.

El metilmercurio es la especie de mercurio más tóxica a la que está expuesta el ser humano en la vida cotidiana debido al consumo de pescado. A pesar de que el consumo de pescado es la fuente principal, existen otras vías como el consumo de agua, cereales, vegetales o carne, aunque su contribución es más limitada. La absorción diaria de todas las especies de mercurio en referencia al consumo de pescado y mariscos se estima en 2,3 ng/día mientras que, el aporte proveniente de otras fuentes se sitúa en 0,3 ng/día. [2]

## Introducción

Ninguna especie de mercurio es esencial para la vida celular, así como tampoco se conocen funciones biológicas en las que tome parte. En relación a la salud humana, el mercurio metálico en fase líquida ( $Hg^0$ ) no presenta, aparentemente, ningún efecto adverso en contacto con la piel; sin embargo, el vapor de mercurio es fuertemente absorbido en el sistema respiratorio (80%), y en menor medida en el tracto gastrointestinal (0.01%). [1] Sin embargo, el mercurio en estado de oxidación divalente  $Hg(II)$  es absorbido de manera significativa en el tracto gastrointestinal (2-38%), y de forma más limitada a través de la dermis. Entre las especies orgánicas, la que mayor toxicidad presenta, como ya se ha comentado, es el metilmercurio, el cual se encuentra ampliamente distribuido por el medioambiente. Las rutas de excreción principales son la orina y las heces. [2] Existen otras rutas secundarias como el sudor, la saliva o la leche materna. También es frecuente la transferencia transplacentaria, creando daños cerebrales en el feto. [5] El metilmercurio es la forma de mercurio que más tiempo persiste en el organismo, aproximadamente entre 70 y 80 días.

Los efectos del mercurio en el organismo pueden ser agudos o crónicos. Los efectos agudos se producen cuando se entra en contacto con una concentración alta del elemento en un momento puntual. Por el contrario, cuando la concentración es muy baja y se produce durante un período de tiempo prolongado, aparecen los efectos crónicos.

Tras una exposición oral a mercurio inorgánico o a vapores de mercurio elemental, se pueden producir alteraciones en el sistema respiratorio y tracto gastrointestinal. También se pueden producir problemas en el sistema cardiovascular, como hipertensiones y taquicardias, y en el sistema neurológico y neuromuscular conduciendo a la pérdida de músculo esquelético y temblores. Además se ven afectados órganos como el hígado o el riñón. Estos efectos llegan a ser letales cuando se produce una ingestión de mercurio inorgánico de entre 10 y 50 mg de mercurio por kilogramo o 1 g de sal de mercurio. Si el mercurio está en su forma orgánica (MeHg) la dosis letal desciende hasta los 100 mg.

Cuando se produce una exposición continuada a cloruro de mercurio por largos períodos de tiempo se produce un envenenamiento lento que tiene como síntomas la colitis, y la tos crónica. Además aumenta el riesgo de sufrir infartos de miocardio, patologías relacionadas con la tiroides, cambio en los riñones y aumento en la producción de creatinina. También aparecen problemas relacionados con el sistema nervioso y el neuromuscular, como demencia, debilidad, insomnio o confusión. [2]



### *1.4 Legislación del mercurio*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que la ingesta total de MeHg no exceda la cantidad de  $1.6 \mu\text{g kg (peso corporal)}^{-1} \text{ semana}^{-1}$  para que el riesgo sea mínimo. Para la protección del desarrollo neurológico de un feto, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) sitúa la dosis máxima en  $0.1 \mu\text{g kg(peso corporal)}^{-1} \text{ día}^{-1}$ . La concentración de  $\text{Hg}^0$  máxima recomendada en el aire fue fijada por la OMS en  $0.2 \mu\text{g m}^{-3}$  con el fin de prevenir intoxicaciones por exposiciones durante largos períodos de tiempo. [1]

En un estudio llevado a cabo por el consorcio internacional [6] en el que participan 17 países europeos, se pretendió establecer una relación entre la concentración de contaminantes presentes en el organismo de los sujetos y las posibles fuentes de contaminación. Entre estos contaminantes se encontraba el mercurio. Para ello se analizaron diferentes muestras biológicas (orina y pelo). Los sujetos eran niños de entre 6 y 11 años y sus madres de 45 años o menos. Los sujetos pertenecían a diferentes áreas (urbanas y rurales) de los diferentes países y con diferentes ambientes. Los valores medios obtenidos fueron  $0.14 \mu\text{g/g}$  en el caso de los niños y  $1.3 \mu\text{g/g}$  en el caso de las madres, mientras que la OMS sitúa el valor máximo en  $2.3 \mu\text{g/g}$ . Sin embargo, los resultados mostraron que la concentración de contaminantes era mayor en los niños entre 6 y 8 años que en los más mayores. Además, la concentración de mercurio en los niños estaba directamente relacionada con los niveles determinados en sus correspondientes madres. La ingesta de pescado fue la principal fuente de exposición al mercurio; sin embargo se aprecian diferencias entre los países del este y España y Portugal donde los niveles son más altos debido, a priori, al consumo de especies depredadoras de pescado. España y Portugal se presentaron como los países con niveles de concentración seis y cinco veces, respectivamente, por encima de la media establecida.

### *1.5 Análisis de especiación del mercurio*

Hoy en día está claramente establecida la necesidad de la determinación, no sólo de la cantidad total de un elemento en una muestra sino de las distintas especies químicas en que se encuentra distribuido ese elemento en dicha muestra. La “especiación” va a determinar la distribución geoquímica del elemento en el medioambiente, así como su biodisponibilidad y/o toxicidad hacia los distintos organismos y los seres humanos. El caso del mercurio es un ejemplo claro donde es necesario realizar análisis de especiación debido a la distinta toxicidad de las especies de Hg que se pueden encontrar en las muestras biológicas y medioambientales como tejidos de pescado o muestras humanas biológicas (sangre, pelo y orina).

## Introducción

Este tipo de muestras, al ser de origen biológico, presentan una matriz muy compleja. Por esta razón su tratamiento debe perseguir la separación del analito de su matriz en el mayor grado posible sin degradar el analito y sin que se produzcan interconversiones entre las especies de Hg que estén presentes en la muestra.

### **1.5.1 Métodos de extracción asistidos por microondas para el análisis de especiación de mercurio en muestras biológicas**

En el caso de matrices sólidas, es necesaria la aplicación de energía para digerir la matriz sólida y disolver los analitos en una fase líquida o para extraer los analitos de la matriz sólida. Existen diversas técnicas de extracción como pueden ser la extracción asistida por microondas, ultrasonidos o la extracción acelerada con disolventes (ASE). A lo largo de este trabajo se utilizará una técnica de microondas focalizadas.

Estudios anteriores [7] proponen la digestión en un equipo de microondas focalizadas, con potencias entre 20 W y 160 W entre 2 y 10 minutos. Prácticamente no existió degradación para el MeHg después de 8 minutos de radiación. Sin embargo, se observó una pérdida significativa de EtHg después de 2 min a 40 W. Otro estudio [8] en el que fue analizado un material de referencia certificado de pelo humano (IAEA-086), propone la utilización de la digestión asistida por microondas a 75° durante 6 minutos y un posterior calentamiento en horno durante dos horas consiguiéndose una recuperación del analito del 90% y un porcentaje de interconversiones muy bajo. Un estudio llevado a cabo por la Universidad de Pau y la universidad Autónoma de Barcelona [9] evaluó la eficacia de la extracción de las especies organometálicas del mercurio de compuestos con matrices de interés ambiental. Se llevó a cabo un análisis por dilución isotópica para observar la influencia real que tenían las microondas sobre las diferentes especies. Se estudiaron las ventajas que este tipo de análisis suponían sobre los análisis previamente establecidos, discutiendo diferentes aspectos como la posibilidad de utilizar viales de vidrio desechables, un auto-control del equipo con el fin de asegurar el control de la presión y temperatura dentro de los viales, y la posibilidad de automatizar la secuencia empleando pequeñas cantidades de muestra. Los resultados mostraron que en este tipo de análisis se obtenían extracciones rápidas y seguras de las diferentes especies organometálicas, pudiendo utilizar un rango amplio de condiciones de extracción.

### **1.5.2 Técnicas de separación cromatográfica para realizar el análisis de especiación de Hg**

Para llevar a cabo la cuantificación de las diferentes especies de mercurio, es necesario realizar una separación previa de las mismas. Dicha separación se lleva a cabo en la mayoría de las

## Introducción

ocasiones utilizando una técnica cromatográfica. Las más utilizadas en el análisis de especiación de Hg son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases (GC). [10] En HPLC separamos compuestos no volátiles, polares o de alto peso molecular por lo que tiene un amplio rango de aplicación. Por otro lado la cromatografía de gases se utiliza para llevar a cabo la separación de compuestos volátiles y térmicamente estables, o compuestos no volátiles o polares que puedan ser transformados químicamente mediante reacciones de derivatización para disminuir su punto de ebullición y/o aumentar su estabilidad térmica. En general, el rango de aplicación de la GC es menor que el de HPLC, pero como ventaja ofrece una mayor resolución cromatográfica.

### **1.5.3 Técnicas de detección para el análisis de especiación de Hg**

La detección más común del mercurio total es la espectrometría de fluorescencia atómica. [10-14] Sin embargo, debido a los diferentes niveles de toxicidad que presentan cada una de las especies de mercurio, es necesario realizar la determinación y cuantificación cada una de las especies por separado. La técnica de separación más utilizada, como se mencionó anteriormente es la cromatografía de gases. De forma habitual, se acopla a espectrómetros de masa con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) masas [8, 10, 12-17] Sin embargo, esta técnica presenta algunos inconvenientes como el elevado coste que supone su adquisición y mantenimiento.

Como alternativa a esta técnica se puede utilizar la GC acoplada a la espectrometría de masas convencional (GC-MS) y en tándem (GC-MS/MS). Los equipos de GC-MS son ampliamente utilizados en laboratorios de rutina para llevar a cabo la determinación de distintas especies organometálicas. En el caso de la espectrometría de masas en tándem, la fragmentación de los compuestos en moléculas más pequeñas se produce en una celda de colisión. Esta contiene un gas (nitrógeno o argón), y cuando los iones de los analitos pasan por dicha celda se aplica una energía que provoca el choque entre las moléculas, lo cual generará su fragmentación. Este proceso se denomina Disociación Inducida por Colisión (CID). Esta técnica presenta algunos inconvenientes ya que pueden producirse multitud de interferencias espectrales en comparación con un GC-ICP-MS. [16] Sin embargo, el coste de este tipo de análisis es mucho menor que el del ICP-MS por lo que, es una alternativa para la determinación rutinaria de las diferentes especies de mercurio.

### 1.6 Análisis por dilución isotópica

La mayor parte de los elementos poseen al menos dos isótopos estables. Un elemento de notable interés isotópico es el carbono ya que de cada 100 átomos de carbono aproximadamente uno posee masa 13 mientras que los 99 restantes poseen masa 12. Por tanto, una molécula orgánica que posea en su estructura un número elevado de átomos de carbono tendrá una probabilidad elevada de poseer algún átomo de carbono de masa 13. Las moléculas orgánicas además de carbono, pueden poseer metales ligados como el mercurio. El mercurio posee siete isótopos estables. Cada uno de estos isótopos posee una abundancia isotópica determinada en la naturaleza como se muestra en **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Isótopos estables del mercurio y sus correspondientes abundancias isotópicas.

Isótopos de mercurio	Abundancia (%)
$^{196}\text{Hg}$	0,15
$^{198}\text{Hg}$	10,02
$^{199}\text{Hg}$	16,40
$^{200}\text{Hg}$	23,13
$^{201}\text{Hg}$	13,22
$^{202}\text{Hg}$	29,8
$^{204}\text{Hg}$	6,86

El concepto de dilución isotópica es el mismo que en los experimentos de captura, marcaje y liberación que se utilizan en Biología para el estudio de poblaciones de animales. Este concepto se basa en añadir un número conocido de individuos marcados a una población que reside en sistemas cerrados. Este concepto fue empleado por primera vez en estudios ecológicos en 1895 por C.G.J. Petersen [18] para estimar la población de una especie de pez (solla) en el fiordo de Limfjord en Dinamarca.

El análisis por dilución isotópica se utiliza para determinar la concentración de una especie química específica de un elemento. [17] Esta técnica está basada en la medida de las 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. [19] Es decir, alteramos la proporción natural de los isótopos de un elemento presente en una muestra añadiendo uno o varios trazadores. De este modo se establece una relación entre los isótopos naturales y los añadidos que se mantendrá invariable a lo largo del proceso analítico siempre y cuando se cumplan unas determinadas condiciones. Esta relación

entre isótopos proporciona la mayor ventaja de esta técnica ya que, al mantenerse invariable, nos permite corregir pérdidas eventuales de analito o alteraciones que puedan sufrir las especies durante todo el proceso de análisis.[17] Este tipo de análisis se puede aplicar tanto a elementos como a compuestos.

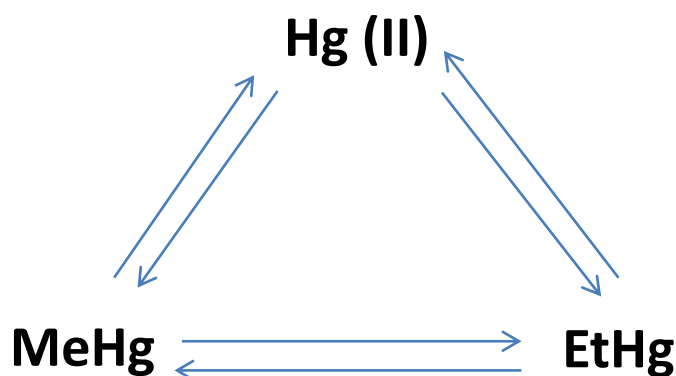
### *1.7 La dilución isotópica en análisis de especiación*

En el caso de los equipos ICP-MS, estos no son capaces de proporcionar información sobre las diferentes formas (químicas, físicas o morfológicas) en las que el elemento de interés se encuentra en una muestra determinada. Por tanto, a la hora de aplicar el análisis por dilución isotópica en especiación elemental se necesita una separación previa de las distintas especies a determinar en el espectrómetro de masas. [19] Las técnicas de separación más empleadas son la cromatografía líquida (HPLC) y la cromatografía de gases (GC), como se mencionó anteriormente.

La dilución isotópica requiere del uso de un trazador que contenga las especies a analizar marcadas isotópicamente. Estas 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, este tipo de análisis proporciona las ventajas de la dilución isotópica convencional: se mantiene la relación entre especies evitando errores por degradación o pérdida de analito.

Otra ventaja que proporciona este tipo de análisis es que se hace innecesaria la realización de un calibrado ya que el comportamiento químico de la especie marcada es análogo al de la especie no marcada.

Un rasgo muy importante que ofrece el análisis por dilución isotópica en análisis de especiación es que para la mayor parte de los elementos se pueden escoger entre varios isótopos en los que se pueden enriquecer el elemento. Este aspecto es especialmente útil cuando se desean analizar varias especies del mismo elemento y existe riesgo de transformaciones entre las mismas. Si cada especie a analizar se enriquece en un isótopo distinto (trazadores isotópicos múltiples) es posible realizar la corrección de estas transformaciones y la cuantificación simultánea de todas las especies en la muestra. [19] En la **Figura 4** se representan las diferentes rutas de interconversión que pueden tener lugar a lo largo de un análisis de especiación de Hg.



**Figura 4.** Posibles conversiones entre las diferentes especies de mercurio que pueden ocurrir a lo largo de un análisis de especiación.

El uso de trazadores isotópicos múltiples es especialmente útil en el análisis de las distintas especies de mercurio presentes en una matriz sólida cuando existe riesgo de interconversión entre especies.

Los trazadores isotópicos múltiples son aquellos en los que cada especie de interés está enriquecida en un isótopo distinto. [19] Algunos aspectos importantes a tener en cuenta son el efecto matriz en las reacciones de interconversión, la equilibración isotópica que se alcanza antes de que se produzca la degradación, y la extracción cuantitativa de las muestras sólidas. [20]

El análisis por dilución isotópica con triple trazador fue llevado a cabo por primera vez [21] en un estudio de validación de especiación de compuestos de butilestaño por GC-ICP-MS. La disolución contenía monobutilestaño, dibutilestaño y tributilestaño, cada uno de los cuales enriquecido con un isótopo de estaño diferente.

En el primer análisis por dilución isotópica con trazador múltiple utilizando GC-MS [16] se analizaron dos materiales de referencia de pescados diferentes, BCR-464 y DOLT-4, en los cuales se certificaban concentraciones de metilmercurio y mercurio total. En este caso se llevó a cabo una dilución isotópica con trazador doble para la determinación del metilmercurio y el mercurio inorgánico. Se calcularon las concentraciones teniendo en cuenta, además de las posibles interconversiones, posibles impurezas que puedan aparecer en las disoluciones isotópicamente enriquecidas provenientes de otras especies de mercurio. El método fue

## Introducción

validado para estos dos materiales y los resultados comparados con los resultados obtenido por GC-ICP-MS.

OBJETIVO



## 2. Objetivo

El objetivo de este proyecto es la evaluación de una metodología para el análisis de especiación de Hg en muestras biológica por dilución isotópica utilizando trazadores múltiples. La metodología estudiada está basada en el uso de un trazador isotópico triple formado por MeHg enriquecido en el isótopo 201, Hg(II) enriquecido en el isótopo 199 y EtHg enriquecido en el isótopo 198 en combinación con un procedimiento de preparación de muestra basado en el uso de microondas focalizadas. La evaluación de la metodología analítica se realizará analizando los materiales de referencia certificados DOLT-4 (hígado de pez perro), IAEA-085 (pelo humano), IAEA-086 (pelo humano) y SRM-955c (sangre de cabra). El análisis de estos materiales se llevará a cabo empleando la cromatografía de gases acoplada a tres tipos de espectrómetro de masas: GC-ICP-MS, GC-MS y GC-MS/MS.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 3. Procedimiento experimental

#### 3.1 Instrumentación

La determinación de MeHg, EtHg y Hg (II) se llevó a cabo utilizando dos equipos diferentes. En primer lugar se utilizó un cromatógrafo de gases modelo Agilent 6890N (Agilent Technologies, Tokio, Japón) equipado con un inyector split/splitless y una columna capilar HP-5MS (30m x 0.53mm i.d., 1  $\mu$ m de recubrimiento). El cromatógrafo de gases se acopló a un espectrómetro de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo modelo Agilent 7500 c utilizando una línea de transferencia comercializada por ISC-Science (Oviedo, España). El otro equipo empleado a lo largo de este Trabajo de Fin de Máster fue un cromatógrafo de gases modelo 7890A (Agilent Technologies, Tokio, Japón) equipado con un inyector multimodo y una columna capilar DB-5MS (30m x 0.25mm i.d., 0.25  $\mu$ m de recubrimiento). El cromatógrafo se acopló a un espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo modelo Agilent 7000.

Las cantidades de muestras y patrones empleadas se corrigieron gravimétricamente utilizando una balanza analítica Metler Toledo (Zurich, Suíza) –AB204-S (0.0001 g). Además, también se realizaron en esta balanza las pesadas para la determinación del porcentaje de humedad de los distintos materiales de referencia certificados. La extracción de las muestras se realizó en un equipo de microondas focalizadas Explorer Hybrid de CEM Corporation (Matthews, NC, EEUU). El pH se ajustó con un pH-metro Basic 20 CRISON (Alella, Barcelona, España). La centrifugación de las muestras derivatizadas se realizó utilizando una centrífuga modelo CENTRO-8 BL (JP Selecta, Barcelona, España). El proceso de evaporación del agua para la determinación del porcentaje de humedad de los distintos materiales se llevó a cabo en la estufa Heraeus Oven, (Thermo Scientific, Bremen, Alemania)

#### 3.2 Reactivos y materiales

La disolución de MeHg enriquecido en  $^{201}\text{Hg}$ , la disolución de Hg (II) enriquecido en  $^{199}\text{Hg}$  y la de EtHg enriquecido en  $^{198}\text{Hg}$  se adquirieron en ISC-Science (Oviedo, España). La posterior dilución de las disoluciones se realizó utilizando una mezcla 3:1 de ácido acético (Merck, Darmstadt, Germany) y metanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA). Estas tres disoluciones enriquecidas fueron caracterizadas por dilución isotópica inversa con disoluciones de abundancia natural de cada compuesto. Las diluciones posteriores de Hg(II) enriquecido con  $^{199}\text{Hg}$  se realizaron con HCl 2% destilado en agua Milli-Q. Todas las disoluciones de patrones enriquecidos isotópicamente se almacenaron a  $-18^\circ\text{C}$  en condiciones de oscuridad hasta el

## Procedimiento experimental

momento del análisis. Las características de los materiales de referencia certificados analizados a lo largo de este Trabajo se recogen en la **Tabla 3**. En las digestiones de las muestras se utilizó hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) al 25% (Sigma-Aldrich). El ajuste de pH se llevó a cabo utilizando una disolución reguladora de ácido acético/acetato de sodio 0.1M preparado a partir de la disolución de acetato de sodio (Sigma-Aldrich) en agua Milli-Q y ajustando el pH a 4 con ácido acético glacial (Sigma-Aldrich). La limpieza de la fase orgánica después de la extracción se llevó a cabo utilizando Florisil® (Sigma-Aldrich). Las barras agitadoras magnéticas con recubrimiento de politetrafluoroetileno (PTFE) y los viales de vidrio desechables de 10 mL utilizados en la extracción del microondas se adquirieron a CEM Corporation. En la propilación de las especies de mercurio se utilizó una disolución de tetrapropilborato de sodio (ABCR, Karlsruhe, Alemania) al 2% en agua Milli-Q. Finalmente se empleó hexano (Sigma-Aldrich) para realizar la extracción de los compuestos de mercurio derivatizados. Se preparó también una disolución patrón de 1ppm de MeHg, EtHg y Hg(II) de abundancia isotópica natural para la optimización de distintos parámetros instrumentales.

**Tabla 3.** Materiales de referencia certificados analizados a los largo del presente Trabajo de Fin de Máster.

Niveles certificados (mg kg <sup>-1</sup> )				
Nombre	Matriz	Me Hg	Hg (II)	THg
DOLT-4	Hígado de pez perro	1.33 ± 0.12	-	2.58 ± 0.22
IAEA-086	Pelo humano	0.26 ± 0.02	-	0.57 ± 0.04
IAEA-085	Pelo humano	22.9 ± 1.0	-	23.2 ± 0.80
SRM 955c	Sangre de cabra	-	-	0.03 ± 0.002

### 3.3 Procedimientos

#### 3.3.1 Determinación del porcentaje de humedad

La determinación de la humedad de los diferentes materiales de referencia certificados se llevó a cabo pesando 0.2 g en el caso de IAEA-085 y IAEA-086, y 0.5 g en el caso de DOLT-4, y manteniéndolos en la estufa a 90°C durante 24 horas, realizando una primera pesada a las 4h y pesadas posteriores hasta obtener un peso constante.

### **3.3.2 Extracción sólido-líquido de las muestras**

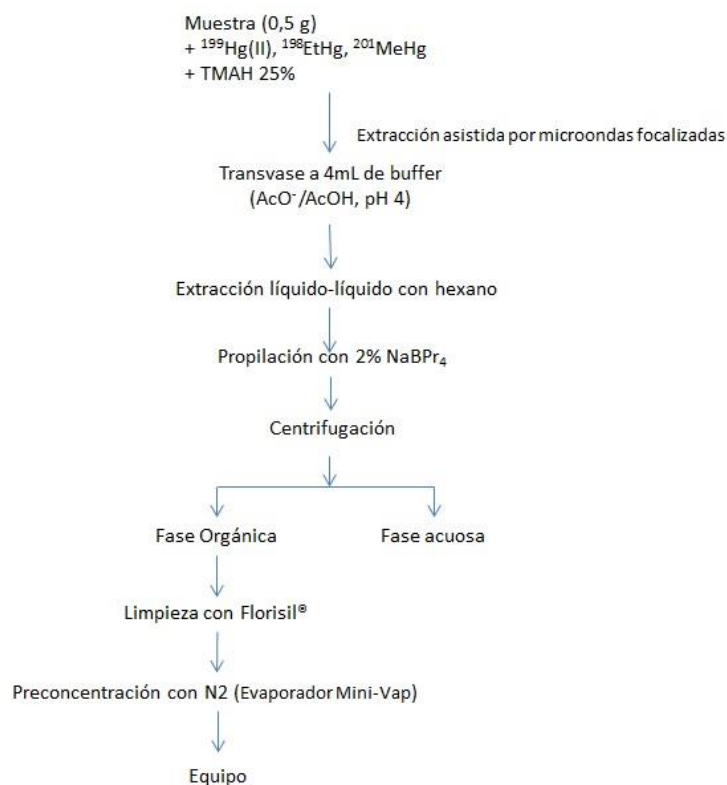
Se pesaron 0.5 g de muestra en el caso del SRM 955c, 0.1 g de muestra en los casos del IAEA-086 y IAEA-085, y 0.15 g de muestra en el caso del DOLT-4, directamente en un vial de vidrio de 10 mL específicamente diseñado para el equipo de microondas focalizadas. Inmediatamente, se añadió a la muestra cantidades adecuadas de cada uno de los tres trazadores isotópicos de modo que se estableciera una proporción aproximada de 1:1 entre la cantidad de especies de Hg presentes en la muestra y la cantidad de especies enriquecidas añadidas. A continuación, se añadieron 4 mL de TMAH al 25%, se cerró el vial con un tapón de PTFE específicamente diseñado para la unidad de microondas focalizadas y se realizó la extracción fijando la potencia a 35 W durante 4.5 minutos. [14]

### **3.3.3 Propilación, separación y determinación de las especies por GC-ICP-MS, GC-MS y GC-MS/MS.**

Tras la digestión de las muestras, el extracto se transfirió a un vial de vidrio de 22 mL al que previamente se le añadieron 4 mL de disolución reguladora ácido acético/acetato de sodio (pH 4). A continuación, se reajustó el pH a 4 añadiendo unas gotas de HCl concentrado ultrapuro. La derivatización consistió en añadir 0.6 mL de tetrapropilborato de sodio al 2% y 1 mL de hexano para realizar simultáneamente la derivatización y la extracción líquido-líquido de las especies derivatizadas a un disolvente orgánico. Para realizar la derivatización y la extracción se agitaron los viales manualmente durante 5 minutos. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, y, una vez separadas las fases, se extrajo la mayor parte de la fase orgánica y se limpió utilizando columnas de Florisil® hechas en el laboratorio con pipetas Pasteur y lana de vidrio. Finalmente, la fase orgánica se transfirió a un vial de vidrio de 2mL y se almacenó a -18°C hasta el momento del análisis. Justo antes de proceder a la inyección de las muestras se realizó un paso adicional que consistió en la preconcentración de las muestras evaporando el hexano en una línea de nitrógeno utilizando un preconcentrador Minivap (Supelco, Bellefonte PA, EEUU). Todas las muestras se preconcentraron hasta alcanzar un volumen final de aproximadamente 10 µL.

En la **Figura 5** podemos observar un esquema del procedimiento completo de la preparación de las muestras.

## Procedimiento experimental



**Figura 5.** Representación esquemática del procedimiento de preparación de las muestras empleado en este Trabajo Fin de Máster para la determinación de MeHg, EtHg y Hg(II).

### 3.3.4 Medida de relaciones isotópicas mediante GC-ICP-MS

Para la medida correcta de las relaciones isotópicas de Hg específicas de cada especie mediante GC-ICP-MS se llevó a cabo, en cada sesión de medida, una optimización previa del sistema ajustando el potencial de las lentes iónicas utilizando la señal de los iones poliatómicos  $^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$  y  $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ . Los parámetros instrumentales empleados se muestran en la **Tabla 4**. Todas las muestras se inyectaron por triplicado en el sistema GC-ICP-MS para poder obtener la incertidumbre asociada a la determinación instrumental. La integración de los picos cromatográficos se realizó utilizando el software comercial proporcionado con el equipo ICP-MS. Las relaciones isotópicas se calcularon como relaciones de área de pico. El tiempo de integración por isótopo fue de 80 ms, y las relaciones m/z medidas fueron 198, 199, 200, 201 y 202.

**Tabla 4.** Parámetros experimentales empleados en el sistema GC-ICP-MS.

ICP-MS	Agilent 7500ce
Gas auxiliar	1.4 L/min
Octapole bias	-16 V
QP bias	-18 V
Tiempo de integración	0.08 s
Modo de adquisición	Análisis en tiempo resuelto (TRA)
Isótopos monitorizados	198, 199, 200, 201, 202
Sistema GC	Agilent 6890N
Temperatura inicial	40°C (1min)
Gradiente de temperatura	20°C/min
Temperatura final	250°C (1min)
Temperatura de la interfase	275°C
Temperatura del inyector	250°C

El efecto de la discriminación de masas se corrigió utilizando una corrección interna basada en la minimización de la suma de los cuadrados de los residuales del ajuste por regresión lineal múltiple entre las abundancias isotópicas experimentales y las calculadas de los tres compuestos analizados. [22] Asumiendo que este efecto es el único factor que no se puede controlar en la medida, obtenemos un factor de discriminación de masas para cada inyección minimizando la suma total de los cuadrados de los residuales en las tres regresiones lineales. Este cálculo proporciona una corrección sin llevar a cabo procedimientos externos como la medida adicional de relaciones isotópicas de patrones de abundancia natural (intercalando su medida entre la medida de las muestras) o procedimientos internos (basados en la introducción simultánea de elementos naturales o especies durante la cromatografía).

### 3.3.5 Medida de relaciones isotópicas utilizando GC-MS/MS

La determinación de los compuestos de mercurio mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem se llevó a cabo utilizando dos modos de medida distintos en el mismo equipo: SIM (Selected Ion Monitoring) y SRM (Selected Reaction Monitoring).

En ambos modos de medida, se utilizó helio como gas portador a un flujo constante de 2,25 mL min<sup>-1</sup>. El inyector se mantuvo a una temperatura constante de 250°C y la inyección se realizó con 2 µL de muestra en modo “splitless” (sin división de flujo) con un tiempo de purga

## Procedimiento experimental

de 1 minuto. La rampa de temperaturas utilizada en la columna cromatográfica para cada uno de los segmentos de tiempo se muestra en la Tabla 1. Posteriormente a la separación se llevó a cabo un post-run en modo “back-flush” invirtiendo la dirección del flujo de gas portador a 300°C durante 4 min y a una presión constante de 50 psi. Para ello es necesario el acoplamiento de la columna cromatográfica a una válvula especial en la que se acopla un capilar adicional (Tubo de sílice desactivada) que se conecta directamente con la entrada del espectrómetro de masas. Las temperaturas de la línea de transferencia y la fuente de ionización fueron 280°C y 230°C, respectivamente. Las condiciones del sistema GC-MS fueron optimizadas diariamente utilizando la opción “autotune” del equipo. Para dicha optimización se utilizó PFTBA (perfluorotributilamina) que permitió la calibración de masas utilizando los iones con  $m/z$  69, 219, 264, 414 y 502. Los parámetros utilizados en cada uno de los métodos se reflejan en las **Tablas 5 y 6**.

**Tabla 5.** Rampa de temperaturas utilizada en la separación de las diferentes especies de mercurio por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem.

Rampa de temperaturas	
Temperatura inicial	50°C (1min)
Segmento 1	20°C/min hasta alcanzar 90°C
Segmento 2	15°C/min hasta alcanzar 100°C (0.5min)
Segmento 3	10°C/min hasta alcanzar 120°C
Temperatura final	300°C

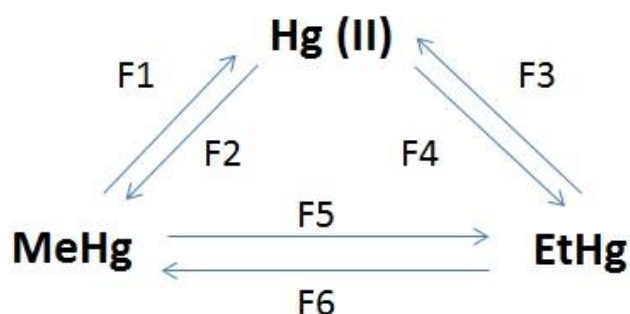


**Tabla 6.** Parámetros experimentales del sistema GS-MS/MS utilizando el método SIM y SRM

<b>Espectrómetro de masas</b>	<b>Agilent 7000A Triple Quadrupolo</b>
Flujo de He <sub>2</sub>	2.25 mL/min
Flujo de N <sub>2</sub>	0 mL/min (SIM) 0.5 mL/min (MRM)
Modo de inyección	Splitless
Temperatura de inyector	250°C
Presión inyección	21 psi
Masas monitorizadas (SIM)	256, 257, 258, 259, 260 (MeHg) 270, 271, 272, 273, 274 (EtHg) 284, 285, 286, 287, 288 (Hg(II))
Transiciones monitorizadas (SRM)	256->241, 257->242, 258->243, 259->244, 260->245 (MeHg) 270->241, 271->242, 272->243, 273->244, 274->245 (EtHg) 284->241, 285->242, 286->243, 287->244, 288->245 (Hg(II))
Energía de colisión	0 V (MeHg y EtHg) y 1 V (Hg(II))
<b>Columna cromatográfica</b>	<b>DB-5MS</b>
Temperatura inicial	50°C
Presión	21psi
Flujo	2 mL/min
<b>Columna 2</b>	<b>(Tubo de sílice fundida desactivada)</b>
Temperatura inicial	50°C
Presión	2psi
Flujo	4.5 mL/min

### 3.3.6 Ecuaciones matemáticas para la determinación de metilmercurio, etilmercurio y Hg(II) mediante dilución utilizando un trazador triple

Las ecuaciones generales de la dilución isotópica con trazador triple están basadas en aquellas desarrolladas previamente para dos especies y dos trazadores. [20] En este caso, se tiene un sistema de tres especies de Hg que se interconvierten tal y como muestra en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Representación de los seis posibles factores de conversión en la determinación de MeHg, EtHg y Hg(II).

Expresando las abundancias isotópicas de la muestra isotópicamente diluida como una función de las abundancias isotópicas naturales del Hg y las abundancias isotópicas de los tres trazadores isotópicos enriquecidos se pueden obtener las fracciones molares de cada especie inicialmente presente en la muestra mediante regresión lineal múltiple.

Por tanto, para cada pico cromatográfico se obtiene una matriz de ecuaciones similar a la Ecuación 1, la cual se resuelve mediante regresión lineal múltiple aplicando la función LINEST de Microsoft EXCEL.

$$\begin{bmatrix} A_m^{198} \\ A_m^{199} \\ A_m^{200} \\ A_m^{201} \\ A_m^{202} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{198} & A_{MeHg}^{198} & A_{Hg(II)}^{198} & A_{EtHg}^{198} \\ A_{nat}^{199} & A_{MeHg}^{199} & A_{Hg(II)}^{199} & A_{EtHg}^{199} \\ A_{nat}^{200} & A_{MeHg}^{200} & A_{Hg(II)}^{200} & A_{EtHg}^{200} \\ A_{nat}^{201} & A_{MeHg}^{201} & A_{Hg(II)}^{201} & A_{EtHg}^{201} \\ A_{nat}^{202} & A_{MeHg}^{202} & A_{Hg(II)}^{202} & A_{EtHg}^{202} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{MeHg} \\ X_{Hg(II)} \\ X_{EtHg} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{198} \\ e^{199} \\ e^{200} \\ e^{201} \\ e^{202} \end{bmatrix} \quad (1)$$

Una vez que los trazadores han sido añadidos a la muestra, se deben tener en cuenta las reacciones de interconversión entre los tres compuestos de Hg en los cuales se han considerado las impurezas de cada una de las disoluciones. Para ello se establecen los siguientes balances de masas:

## Procedimiento experimental

$$N_m^{Hg(II)} = (N_{nat}^{Hg(II)} + N_{tHg(II)}^{Hg(II)} + N_{tMeHg}^{Hg(II)} + N_{tEtHg}^{Hg(II)})(1 - F2 - F4) + (N_{nat}^{MeHg} + N_{tHg(II)}^{MeHg} + N_{tMeHg}^{MeHg} + N_{tEtHg}^{MeHg})F1 + (N_{nat}^{EtHg} + N_{tHg(II)}^{EtHg} + N_{tMeHg}^{EtHg} + N_{tEtHg}^{EtHg})F3 \quad (2)$$

$$N_m^{MeHg} = (N_{nat}^{MeHg} + N_{tHg(II)}^{MeHg} + N_{tMeHg}^{MeHg} + N_{tEtHg}^{MeHg})(1 - F2 - F4) + (N_{nat}^{Hg(II)} + N_{tHg(II)}^{Hg(II)} + N_{tMeHg}^{Hg(II)} + N_{tEtHg}^{Hg(II)})F1 + (N_{nat}^{EtHg} + N_{tHg(II)}^{EtHg} + N_{tMeHg}^{EtHg} + N_{tEtHg}^{EtHg})F6 \quad (3)$$

$$N_m^{EtHg} = (N_{nat}^{EtHg} + N_{tHg(II)}^{EtHg} + N_{tMeHg}^{EtHg} + N_{tEtHg}^{EtHg})(1 - F3 - F6) + (N_{nat}^{Hg(II)} + N_{tHg(II)}^{Hg(II)} + N_{tMeHg}^{Hg(II)} + N_{tEtHg}^{Hg(II)})F4 + (N_{nat}^{MeHg} + N_{tHg(II)}^{MeHg} + N_{tMeHg}^{MeHg} + N_{tEtHg}^{MeHg})F5 \quad (4)$$

Donde  $N$  es el número de moles,  $m$  hace referencia a la muestra isotópicamente diluida,  $nat$  hace referencia a la muestra de abundancia isotópica natural y  $tHg$ ,  $tEtHg$  y  $tMeHg$  corresponden a los tres trazadores isotópicos empleados.

Utilizando las fracciones molares obtenidas según lo descrito en la ecuación 1, se pueden obtener los siguientes sistemas de ecuaciones:

$$X_{nat}^{Hg(II)} N_m^{Hg(II)} = N_{nat}^{Hg(II)}(1 - F2 - F4) + N_{nat}^{MeHg}F1 + N_{nat}^{EtHg}F3 \quad (5)$$

$$X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_m^{Hg(II)} = N_{tHg(II)}^{Hg(II)}(1 - F2 - F4) + N_{tHg(II)}^{MeHg}F1 + N_{tHg(II)}^{EtHg}F3 \quad (6)$$

$$X_{tMeHg}^{Hg(II)} N_m^{Hg(II)} = N_{tMeHg}^{Hg(II)}(1 - F2 - F4) + N_{tMeHg}^{MeHg}F1 + N_{tMeHg}^{EtHg}F3 \quad (7)$$

$$X_{tEtHg}^{Hg(II)} N_m^{Hg(II)} = N_{tEtHg}^{Hg(II)}(1 - F2 - F4) + N_{tEtHg}^{MeHg}F1 + N_{tEtHg}^{EtHg}F3 \quad (8)$$

$$X_{nat}^{MeHg} N_m^{MeHg} = N_{nat}^{MeHg}(1 - F1 - F5) + N_{nat}^{Hg(II)}F2 + N_{nat}^{EtHg}F6 \quad (9)$$

$$X_{tHg(II)}^{MeHg} N_m^{MeHg} = N_{tHg(II)}^{MeHg}(1 - F1 - F5) + N_{tHg(II)}^{Hg(II)}F2 + N_{tHg(II)}^{EtHg}F6 \quad (10)$$

$$X_{tMeHg}^{MeHg} N_m^{MeHg} = N_{tMeHg}^{MeHg}(1 - F1 - F5) + N_{tMeHg}^{Hg(II)}F2 + N_{tMeHg}^{EtHg}F6 \quad (11)$$

$$X_{tEtHg}^{MeHg} N_m^{MeHg} = N_{tEtHg}^{MeHg}(1 - F1 - F5) + N_{tEtHg}^{Hg(II)}F2 + N_{tEtHg}^{EtHg}F6 \quad (12)$$

$$X_{nat}^{EtHg} N_m^{EtHg} = N_{nat}^{EtHg}(1 - F3 - F6) + N_{nat}^{Hg(II)}F4 + N_{nat}^{MeHg}F5 \quad (13)$$

$$X_{tHg(II)}^{EtHg} N_m^{EtHg} = N_{tHg(II)}^{EtHg}(1 - F3 - F6) + N_{tHg(II)}^{Hg(II)}F4 + N_{tHg(II)}^{MeHg}F5 \quad (14)$$

$$X_{tMeHg}^{EtHg} N_m^{EtHg} = N_{tMeHg}^{EtHg}(1 - F3 - F6) + N_{tMeHg}^{Hg(II)}F4 + N_{tMeHg}^{MeHg}F5 \quad (15)$$

$$X_{tEtHg}^{EtHg} N_m^{EtHg} = N_{tEtHg}^{EtHg}(1 - F3 - F6) + N_{tEtHg}^{Hg(II)}F4 + N_{tEtHg}^{MeHg}F5 \quad (16)$$

## Procedimiento experimental

Los factores de conversión pueden obtenerse simplificando estas ecuaciones para desarrollar un sistema de seis ecuaciones con seis incógnitas. Por ejemplo, dividiendo la ecuación (6) por la ecuación (7) se obtiene la ecuación (17):

$$\begin{aligned} & (X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tMeHg}^{MeHg} - X_{tMeHg}^{Hg(II)} N_{tHg}^{MeHg})F1 + (X_{tMeHg}^{Hg(II)} N_{tHg(II)}^{Hg(II)} - X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tMeHg}^{Hg(II)})F2 + \\ & (X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tMeHg}^{EtHg} - X_{tMeHg}^{Hg} N_{tHg}^{EtHg})F3 + (X_{tMeHg}^{Hg(II)} N_{tHg(II)}^{Hg(II)} - X_{tHg}^{Hg} N_{tMeHg}^{Hg})F4 + \\ & (X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tMeHg}^{Hg(II)} - X_{tMeHg}^{Hg} N_{tHg}^{Hg}) = 0 \end{aligned} \quad (17)$$

Dividiendo la ecuación (6) por la ecuación (8) se obtiene la ecuación (18):

$$\begin{aligned} & (X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tEtHg}^{MeHg} - X_{tEtHg}^{Hg(II)} N_{tHg}^{MeHg})F1 + (X_{tEtHg}^{Hg(II)} N_{tHg(II)}^{Hg(II)} - X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tEtHg}^{Hg(II)})F2 + \\ & (X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tEtHg}^{EtHg} - X_{tEtHg}^{Hg(II)} N_{tHg(II)}^{EtHg})F3 + (X_{tEtHg}^{Hg(II)} N_{tHg(II)}^{Hg(II)} - X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tEtHg}^{Hg(II)})F4 + \\ & (X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tEtHg}^{Hg(II)} - X_{tEtHg}^{Hg(II)} N_{tHg(II)}^{Hg(II)}) = 0 \end{aligned} \quad (18)$$

Dividiendo la ecuación (10) por la ecuación (11) se obtiene la ecuación (19):

$$\begin{aligned} & (X_{tMeHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{MeHg} - X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tMeHg}^{MeHg})F1 + (X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tMeHg}^{Hg(II)} - X_{tMeHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{Hg(II)})F2 + \\ & (X_{tMeHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{MeHg} - X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tMeHg}^{MeHg})F5 + (X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tMeHg}^{EtHg} - X_{tMeHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{EtHg})F6 + \\ & (X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tEtHg}^{MeHg} - X_{tEtHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{MeHg}) = 0 \end{aligned} \quad (19)$$

Dividiendo la ecuación (10) por la ecuación (12) se obtiene la ecuación (20):

$$\begin{aligned} & (X_{tEtHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{MeHg} - X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tEtHg}^{MeHg})F1 + (X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tEtHg}^{Hg(II)} - X_{tEtHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{Hg(II)})F2 + \\ & (X_{tEtHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{MeHg} - X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tEtHg}^{MeHg})F5 + (X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tEtHg}^{EtHg} - X_{tEtHg}^{MeHg} N_{tHg}^{EtHg})F6 + (X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tEtHg}^{MeHg} - \\ & X_{tEtHg}^{MeHg} N_{tHg}^{MeHg}) = 0 \end{aligned} \quad (20)$$

Dividiendo la ecuación (14) por la ecuación (15) se obtiene la ecuación (21):

$$\begin{aligned} & (X_{tMeHg}^{EtHg} N_{tHg(II)}^{EtHg} - X_{tHg}^{EtHg} N_{tMeHg}^{EtHg})F3 + (X_{tHg(II)}^{EtHg} N_{tMeHg}^{Hg(II)} - X_{tMeHg}^{EtHg} N_{tHg(II)}^{Hg(II)})F4 + \\ & (X_{tHg(II)}^{EtHg} N_{tMeHg}^{MeHg} - X_{tMeHg}^{EtHg} N_{tHg(II)}^{MeHg})F5 + (X_{tMeHg}^{EtHg} N_{tHg(II)}^{EtHg} - X_{tHg(II)}^{EtHg} N_{tMeHg}^{EtHg})F6 + \\ & (X_{tHg(II)}^{EtHg} N_{tMeHg}^{EtHg} - X_{tMeHg}^{EtHg} N_{tHg}^{EtHg}) = 0 \end{aligned} \quad (21)$$

Dividiendo la ecuación (14) por la ecuación (16) se obtiene la ecuación (22):

## Procedimiento experimental

$$\begin{aligned}
 & (X_{tEtHg}^{EtHg} N_{tHg(II)}^{EtHg} - X_{tHg(II)}^{EtHg} N_{tEtHg}^{EtHg}) F3 + (X_{tHg(II)}^{EtHg} N_{tEtHg}^{Hg(II)} - X_{tEtHg}^{EtHg} N_{tHg(II)}^{Hg(II)}) F4 + (X_{tHg(II)}^{EtHg} N_{tEtHg}^{MeHg} - \\
 & X_{tEtHg}^{EtHg} N_{tHg(II)}^{MeHg}) F5 + (X_{tEtHg}^{EtHg} N_{tHg(II)}^{EtHg} - X_{tHg(II)}^{EtHg} N_{tEtHg}^{EtHg}) F6 + (X_{tHg(II)}^{EtHg} N_{tEtHg}^{EtHg} - X_{tEtHg}^{EtHg} N_{tHg(II)}^{EtHg}) = 0
 \end{aligned}
 \tag{22}$$

De este modo se llega a un sistema lineal de seis ecuaciones (17 a la 22) con seis incógnitas (los seis factores de conversión F1 a F6). Una vez determinados dichos factores mediante la resolución del sistema anterior, se calcula la cantidad de especies de Hg endógenas que hay en la mezcla. Para llevar a cabo este cálculo se debe resolver una matriz de tres ecuaciones con tres incógnitas dividiendo la ecuación (5) por la (6), la (9) por la (11) y la (13) por la (16) dando lugar a las ecuaciones (23), (24) y (25):

$$\begin{aligned}
 & X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{nat}^{Hg(II)} (1 - F2 - F4) + X_{tHg(II)}^{Hg(II)} F1 + N_{nat}^{MeHg} + X_{tHg(II)}^{Hg(II)} F3 N_{nat}^{EtHg} = X_{nat}^{Hg(II)} N_{tHg(II)}^{Hg(II)} (1 - \\
 & F2 - F4) + X_{nat}^{Hg(II)} N_{tHg(II)}^{MeHg} F1 + X_{nat}^{Hg(II)} N_{tHg(II)}^{EtHg} F3
 \end{aligned}
 \tag{23}$$

$$\begin{aligned}
 & X_{tMeHg}^{MeHg} N_{nat}^{MeHg} (1 - F1 - F5) + X_{tMeHg}^{MeHg} F2 N_{nat}^{Hg(II)} + X_{tMeHg}^{MeHg} F6 N_{nat}^{EtHg} = X_{nat}^{MeHg} N_{tMeHg}^{MeHg} (1 - \\
 & F1 - F5) + X_{nat}^{MeHg} N_{tMeHg}^{Hg(II)} F2 + X_{nat}^{MeHg} N_{tMeHg}^{EtHg} F6
 \end{aligned}
 \tag{24}$$

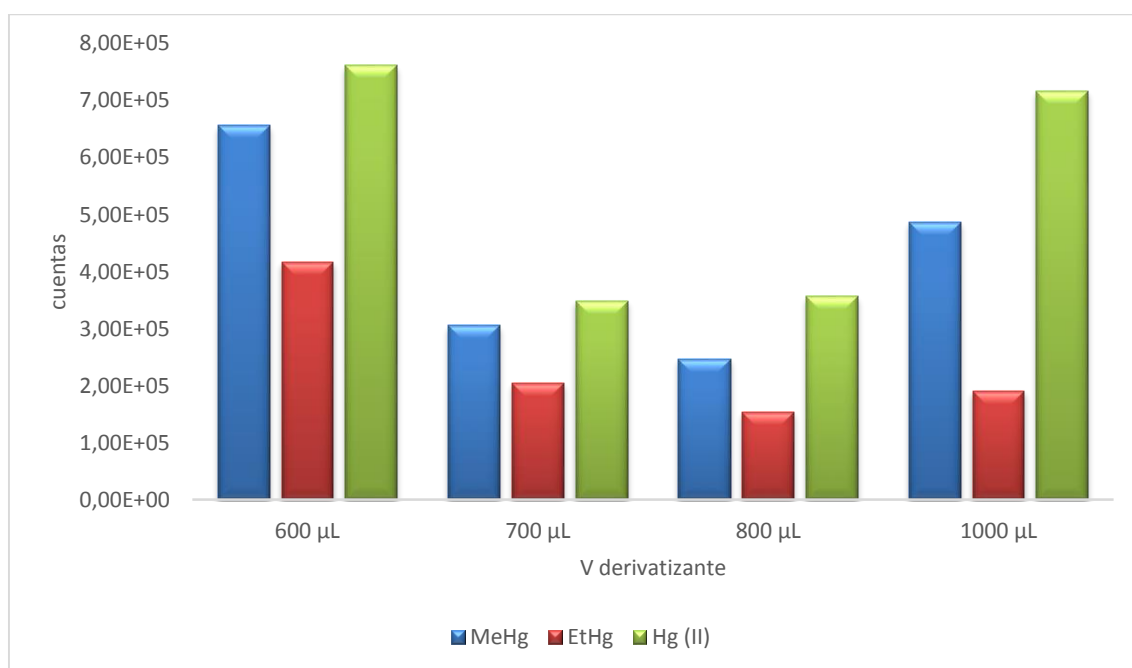
$$\begin{aligned}
 & X_{tEtHg}^{EtHg} N_{nat}^{EtHg} (1 - F3 - F6) + X_{tEtHg}^{EtHg} F4 N_{nat}^{Hg(II)} + X_{tEtHg}^{EtHg} F5 N_{nat}^{MeHg} = X_{nat}^{EtHg} N_{tEtHg}^{EtHg} (1 - F3 - \\
 & F6) + X_{nat}^{EtHg} N_{tEtHg}^{Hg(II)} F4 + X_{nat}^{EtHg} N_{tEtHg}^{MeHg} F5
 \end{aligned}
 \tag{25}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4. Resultados y discusión

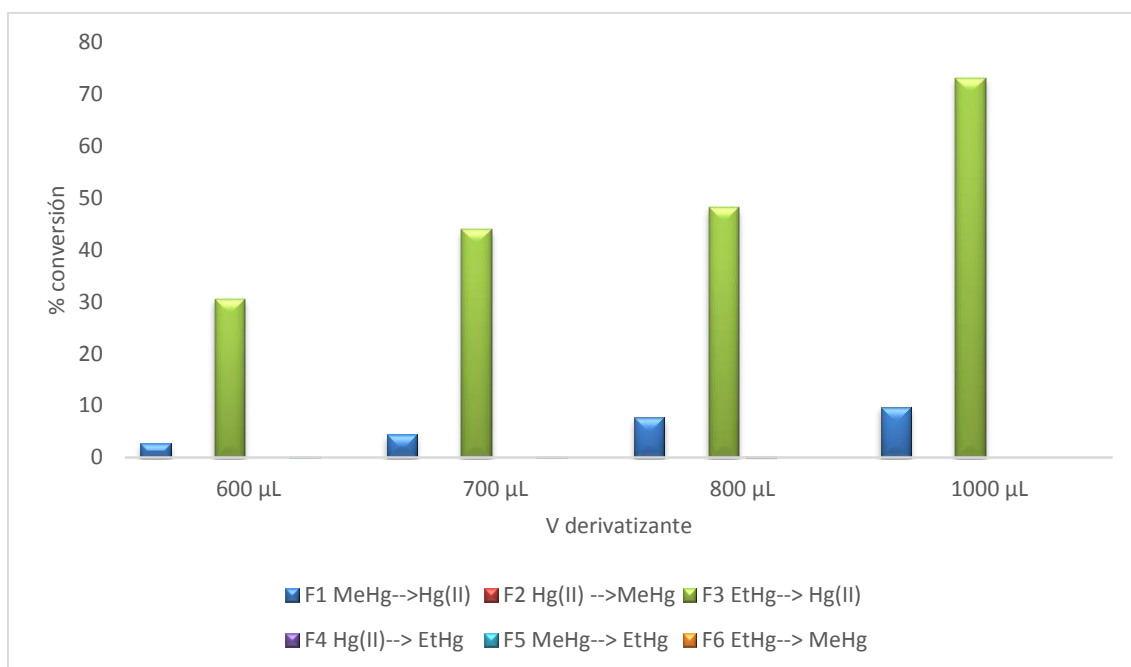
### 4.1 Optimización del volumen de disolución derivatizante NaBPr<sub>4</sub>

Para llevar a cabo el análisis de muestras reales, se procedió en primer lugar a la optimización del volumen de derivatizante NaBPr<sub>4</sub> necesario para obtener la mayor sensibilidad en cada una de las especies de Hg y al mismo tiempo la menor interconversión entre especies. Para ello se analizó el material de referencia SRM 955c (sangre de cabra) certificado en Hg total utilizando distintos volúmenes (entre 600 y 1000 µL) de la disolución derivatizante de NaBPr<sub>4</sub> al 2%. Los resultados obtenidos para cada especie en cada volumen de derivatizante se muestran en la **Figura 7**.



**Figura 7.** Sensibilidad obtenida en el sistema GC-ICP-MS para MeHg, EtHg y Hg(II) en el análisis del material de referencia certificado NIST SRM 955c empleando distintos volúmenes de una disolución de NaBPr<sub>4</sub> al 2%.

Los resultados muestran que utilizando 600 µL de derivatizante se obtiene la sensibilidad más alta para las tres especies de Hg. Sin embargo, también hay que tener en cuenta las transformaciones entre las especies, ya que éstas también dependen del volumen de derivatizante. La **Figura 8** muestra que las reacciones de interconversión más probables son F1 y F3, es decir, la conversión del MeHg y del EtHg en Hg(II), respectivamente y que para 600 µL se obtienen las menores interconversiones. Por tanto, se decidió utilizar este volumen de derivatizante en los análisis posteriores a lo largo de este Trabajo.



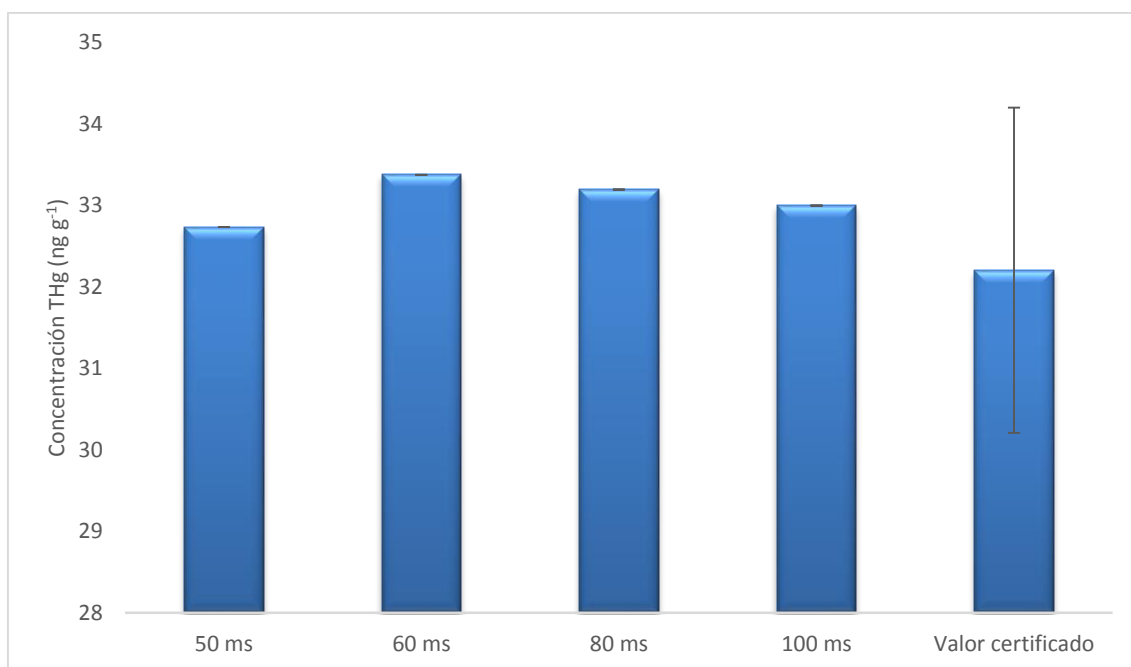
**Figura 8.** Porcentajes de las distintas conversiones que tienen lugar entre las distintas especies de mercurio al analizar el material de referencia certificado SRM 955c por GC-ICP-MS empleando distintos volúmenes de una disolución de NaBPr<sub>4</sub> al 2%.

#### 4.2 Optimización del tiempo de integración en GC-ICP-MS

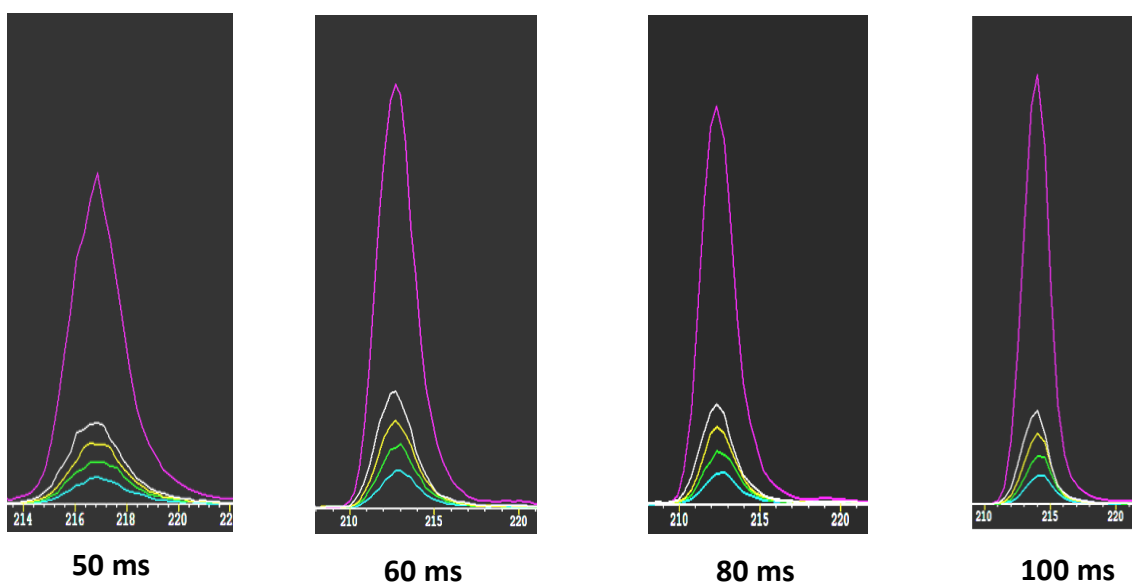
En los análisis llevados a cabo mediante GC-ICP-MS fue necesario optimizar el tiempo de integración, es decir, el tiempo de adquisición que emplea el espectrómetro de masas en cada uno de los isótopos monitorizados para cada una de las especies de mercurio. Para llevar a cabo esta optimización se analizó el material de referencia SRM 955c certificado en Hg total. Los resultados obtenidos para esta optimización se pueden observar en la **Figura 9 y 10**.



## Resultados y discusión



**Figura 9.** Niveles de concentración de mercurio total obtenidos al analizar el material de referencia certificado SRM 955c por GC-ICP-MS utilizando diferentes tiempos de integración (50-100ms). El valor del mercurio total se calculó a partir de la suma de las tres especies de Hg cuantificadas en la muestra.



**Figura 10.** Perfiles de pico obtenidos para los isótopos  $^{198}\text{Hg}$ ,  $^{199}\text{Hg}$ ,  $^{200}\text{Hg}$ ,  $^{201}\text{Hg}$  y  $^{202}\text{Hg}$  proveniente del MeHg presente en el material de referencia SRM 955c mediante GC-ICP-MS utilizando diferentes tiempos de integración (50, 60, 80 y 100 ms).

La forma que presentan cada uno de los picos cromatográficos de cada isótopo de Hg pueden influir en la cuantificación del compuesto. Para que las relaciones isotópicas que se establezcan sean precisas, es necesario que los picos sean lo más estrechos posible y que,

además, las puntas de los picos de cada uno de los isótopos coincidan en el mismo valor  $m/z$ . [23]

En la **Figura 10** se puede observar que en el caso del MeHg en el material SRM 955c, cuando el tiempo de integración es igual a 80 ms, los máximos de los picos cromatográficos de los distintos isótopos de Hg están alineados mientras que a 100 ms se empieza a observar el efecto del desplazamiento espectral. En el caso de valores más bajos como 50 ms, se observa el efecto contrario, se obtienen picos perfectamente centrados pero también una inestabilidad en las señales y menor sensibilidad. En este rango de tiempo de integración no se observan condiciones extremas por lo que todos los tiempos de integración proporcionan valores de Hg total dentro del rango certificado. Sin embargo, se seleccionó para experimentos posteriores el tiempo de integración de 80 ms al presentar una buena sensibilidad y una ausencia de desplazamiento espectral.

### *4.3 Optimización de la energía de colisión en el sistema GC-MS/MS*

El análisis de las muestras acoplado la Cromatografía de Gases a una fuente de ionización electrónica se realizó utilizando el mismo equipo GC-MS/MS de triple cuadrupolo en dos modos distintos: SIM y SRM. En el modo SIM los iones generados en la fuente de ionización son analizados en el primer cuadrupolo mientras que el segundo analizador de masas actúa como “túnel” de iones. En el modo SRM se lleva a cabo, en primer lugar, una selección de los iones precursores de interés. Posteriormente, se hacen pasar por la celda de colisión, que es un hexapolo presurizado con nitrógeno y se aplica una diferencia de potencial entre la entrada y la salida de la celda (energía de colisión). Al aplicar la energía de colisión se consigue que los iones precursores choquen contra las moléculas de nitrógeno y se fragmenten dando los iones producto. Los fragmentos producidos dependerán de la energía aplicada. Estos fragmentos serán analizados por el segundo cuadrupolo que se encuentra a continuación de la celda de colisión. De esta forma conseguimos seleccionar los iones precursores, fragmentarlos y analizar sus iones producto. Esta fragmentación nos aporta no solo información estructural sobre la molécula, permitiéndonos la separación e identificación de compuestos en mezclas complejas, sino también un alto grado de selectividad, lo que se traduce en una disminución drástica de la relación señal/ruido en comparación con otros modos de medida como el SIM.

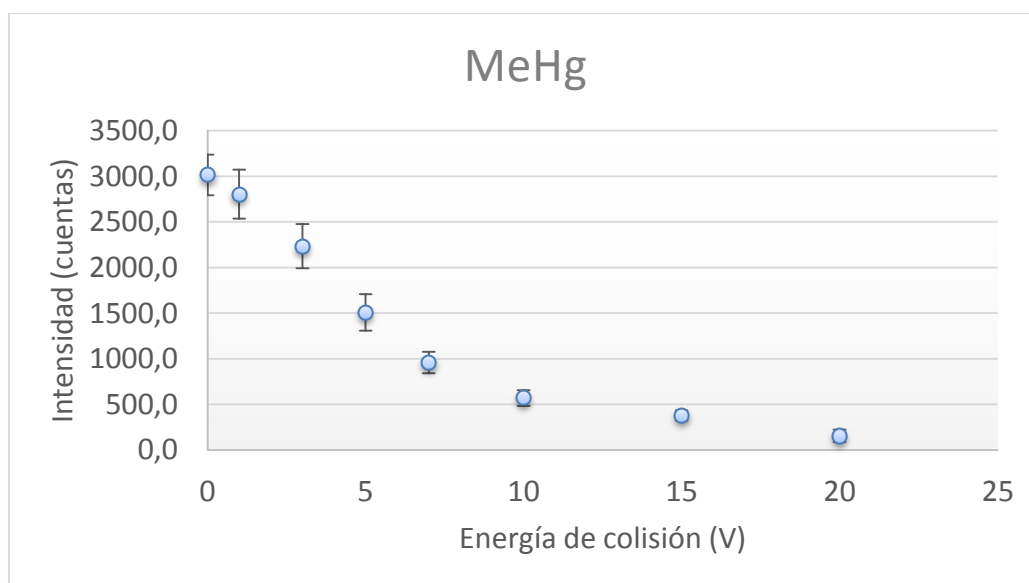
Para optimizar la energía de colisión se analizó un patrón que contenía las tres especies de Hg de abundancias isotópicas naturales en la misma concentración y se monitorizaron las transiciones que se muestran en la **Tabla 7**.

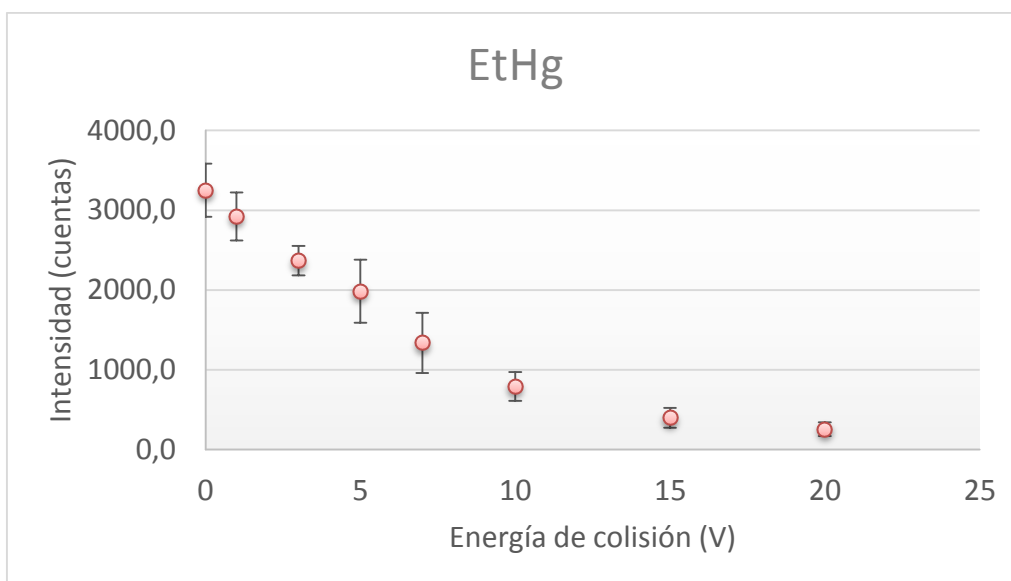
**Tabla 7.** Transiciones monitorizadas para la optimización de la energía de colisión en el análisis de un patrón de MeHg, EtHg y Hg(II) de abundancias isotópicas naturales.

Transiciones monitorizadas		
MeHg	EtHg	Hg(II)
256->241	270->241	284->241
257->242	271->242	285->242
258->243	272->243	286->243
259->244	273->244	287->244
260->245	274->245	288->245

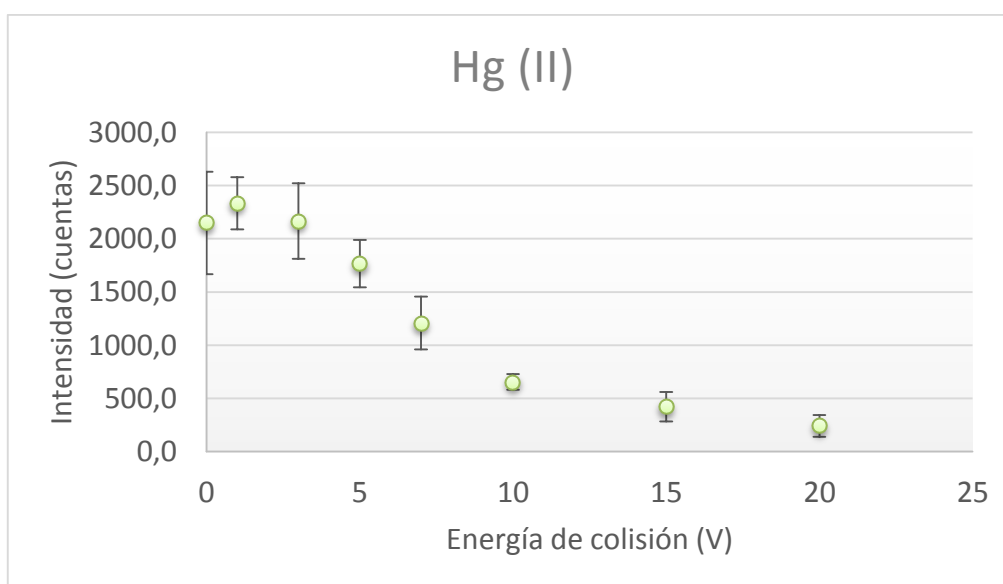
Todos los iones precursores siguen el mismo proceso de fragmentación por ejemplo para el  $\text{Me}^{202}\text{HgPr}$  ( $m/z$  260), la disociación inducida por colisión (CID) fragmenta el ión en  $^{202}\text{HgPr}$  ( $m/z$  245). De este modo las transiciones de los tres compuestos tienen en común la identidad del ión producto. El intervalo de energías de colisión que se empleó para llevar a cabo este estudio fue desde 0 V hasta 20 V.

Los resultados obtenidos para cada una de las especies en función de la sensibilidad instrumental obtenida se muestra en las **Figuras 11, 12 y 13**.

**Figura 11.** Sensibilidad obtenida para la transición 260 → 245 del MeHg empleando diferentes energías de colisión (0-20 V).



**Figura 12.** Sensibilidad obtenida para la transición 274 → 245 del EtHg empleando diferentes energías de colisión (0-20 V).



**Figura 13.** Sensibilidad obtenida para la transición 288 → 245 del Hg(II) empleando diferentes energías de colisión (0-20 V).

A la vista de los resultados, se observa que para el MeHg y el EtHg se obtuvo una mayor sensibilidad a 0 V mientras que el Hg (II) presentaba una mayor sensibilidad a 1 V. A pesar de obtener desviaciones estándar mayores para los valores de energía más pequeños, la diferencia de señal entre los distintos valores de energía es muy notable, por lo que obtendremos mejores fragmentaciones a los valores de energía mencionados.

#### 4.4 Determinación del porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad determinado en los diferentes materiales de referencia certificados siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.3.1 se presenta en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Porcentajes de humedad determinados en tres de los materiales de referencia certificados analizados a lo largo de este Trabajo Fin de Máster.

MRC	Matriz	Humedad (%)
DOLT-4	Hígado de pez perro	4,5
IAEA-086	Pelo humano	11,2
IAEA-085	Pelo humano	9,5

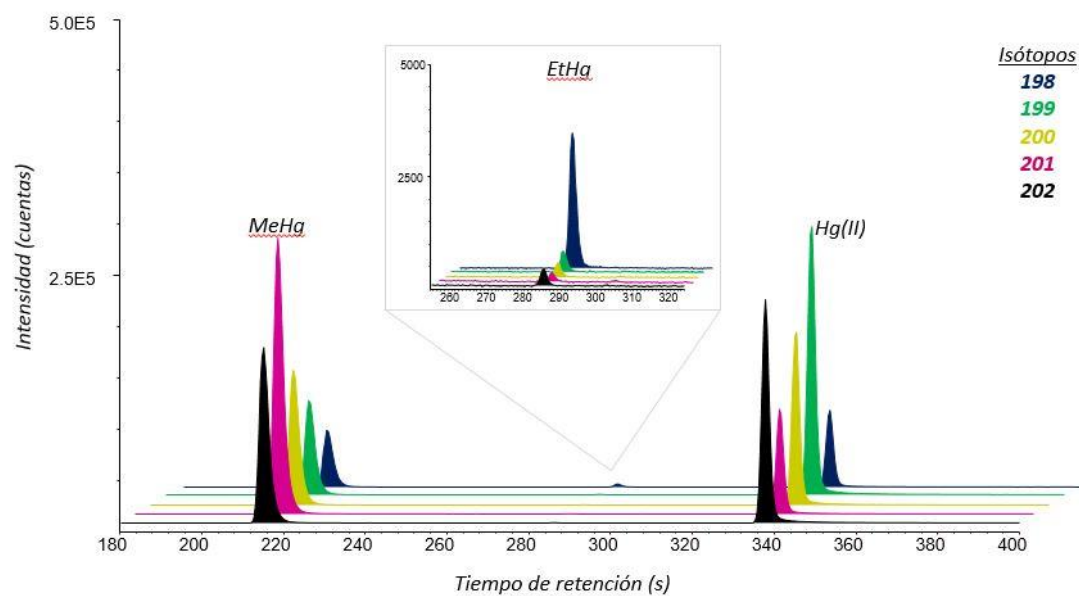
#### 4.5 Análisis de Materiales de Referencia Certificados

A lo largo de este Trabajo de Fin de Master se aplicó el mismo procedimiento de preparación de muestra para el análisis de varios Materiales de Referencia Certificados (CRMs) y cada una de las muestras se analizó utilizando tres técnicas de determinación: GC-ICP-MS, GC-MS y GC-MS/MS. Para ello el mismo equipo GC-MS/MS se utilizó para medir las muestras en modo SIM y SRM. Los resultados se detallan a continuación.

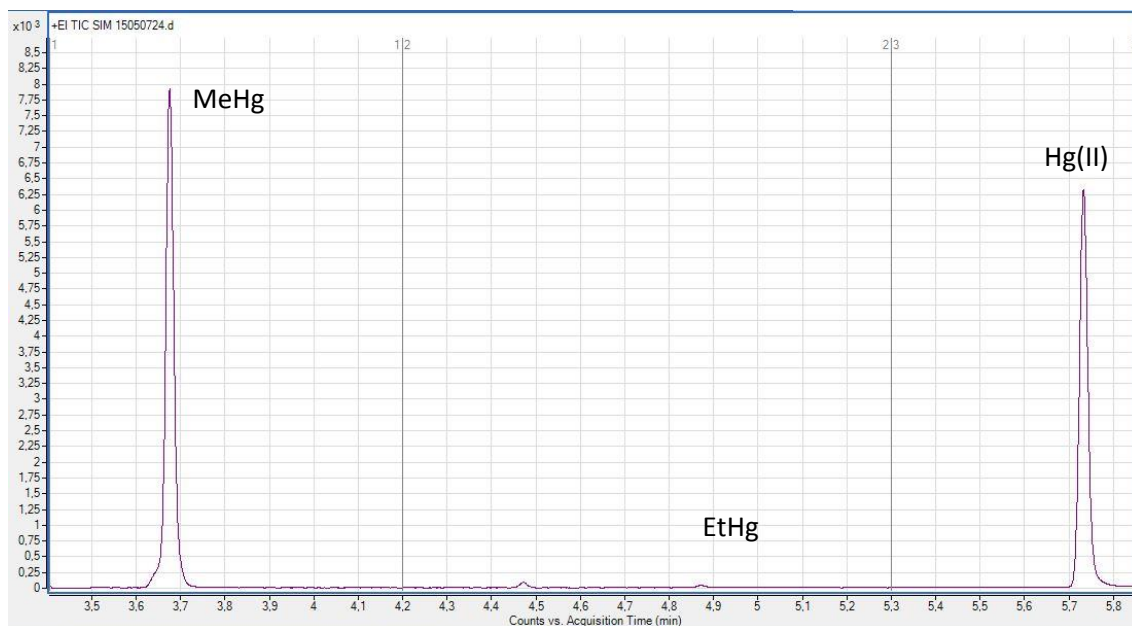
##### 4.5.1 Análisis del material DOLT-4 (Hígado de pez perro)

Los cromatogramas correspondientes a la determinación del metilmercurio, etilmercurio y mercurio inorgánico por GC-ICP-MS, GS-MS en modo SIM y GS-MS/MS en modo SRM para el material DOLT-4 se muestran en las **Figuras 14, 15 y 16**, respectivamente. En el análisis de este material, al no presentar EtHg, se añadió EtHg enriquecido en una cantidad sensiblemente inferior a la del  $^{201}\text{MeHg}$  y  $^{199}\text{Hg}$ .

## Resultados y discusión

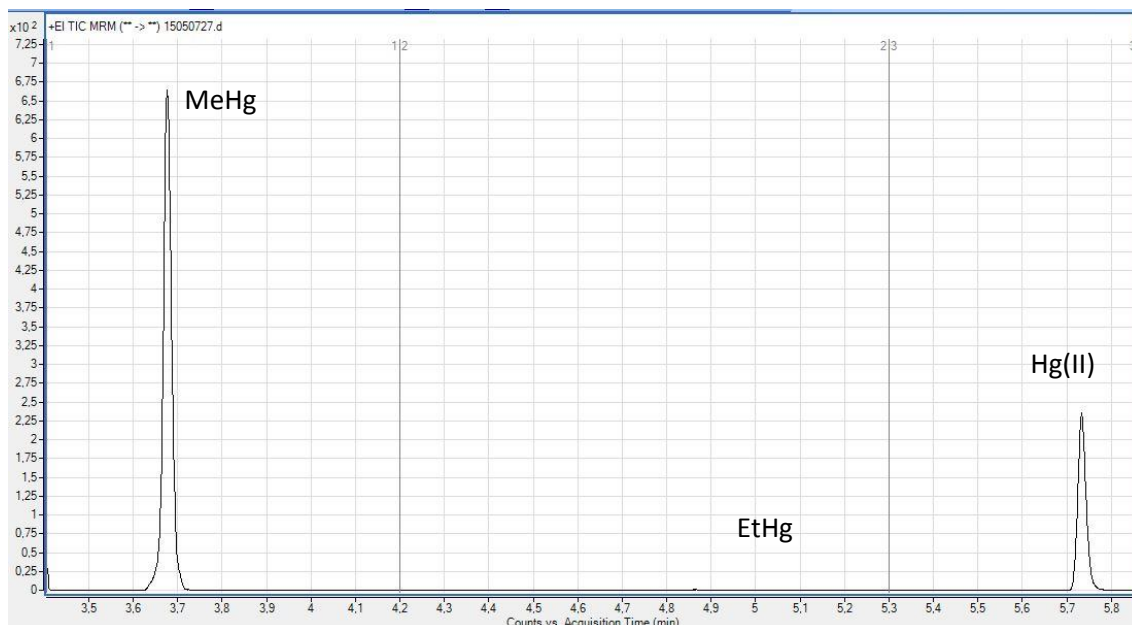


**Figura 14.** Cromatograma GC-ICP-MS de los isótopos de Hg 198, 199, 200, 201 y 202 obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material DOLT-4.



**Figura 15.** Cromatograma GC-MS donde se muestra la señal suma de intensidades de las relaciones  $m/z$  medidas (TIC, Total Ion Count) obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material DOLT-4 obtenido en modo SIM.

## Resultados y discusión



**Figura 16.** Cromatograma GC-MS/MS donde se muestra la suma de intensidades de las diferentes transiciones medidas obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material DOLT-4 en el modo SRM.

Como se puede observar en los cromatogramas de las **Figuras 14, 15 y 16** los picos cromatográficos de cada una de las especies de mercurio están completamente resueltos.

En la **Tabla 10** se muestran los niveles de concentración de MeHg, Hg(II) y Hg total en el material DOLT-4 (*Hígado de pez perro*) obtenidos mediante GC-ICP-MS, GC-MS (SIM) y GC-MS/MS (SRM).

A la vista de los resultados, podemos afirmar que los métodos de análisis utilizados con este material nos proporcionan resultados dentro de los niveles certificados de MeHg ( $1,33 \pm 0,12 \mu\text{g g}^{-1}$ ) y de mercurio total ( $2,58 \pm 0,22 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

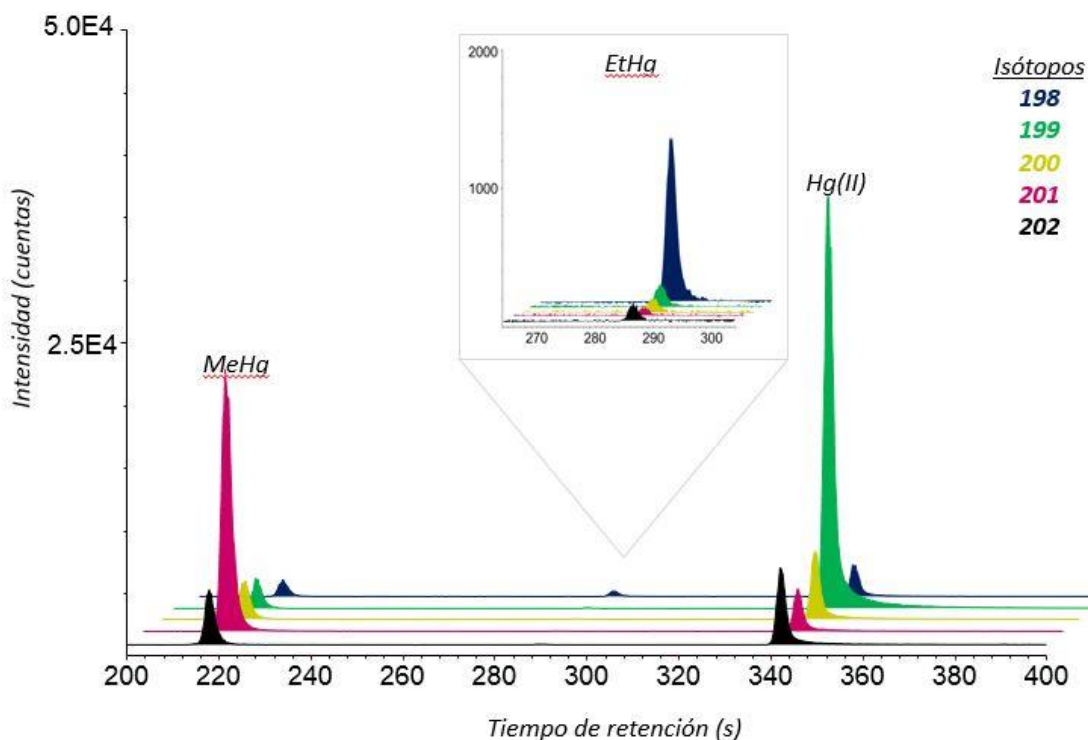
Además, la **Tabla 9** muestra los valores de desviación estándar relativa (%) por lo que se puede observar que se obtienen valores RSD menores del 7% entre n=3 extracciones independientes.

**Tabla 9.** Valores de concentración obtenidos para las tres especies de mercurio y para el Hg total (suma de las tres especies) en el material DOLT-4 analizado mediante GC-ICP-MS, GC-MS y GC-MS/MS. La incertidumbre de los valores corresponde a la desviación estándar obtenida de n=3 inyecciones independientes. La tabla muestra también los valores de la desviación estándar relativa RSD (%).

	GC-ICP-MS		GC-MS		GC-MS/MS		Valores certificados
	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD %	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD %	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD %	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
<b>MeHg</b>	1,34 $\pm$ 0,02	1,61	1,36 $\pm$ 0,02	1,7	1,34 $\pm$ 0,03	2,0	1,33 $\pm$ 0,12
<b>EtHg</b>	No detectado	-	No detectado	-	No detectado	-	-
<b>Hg(II)</b>	1,36 $\pm$ 0,08	5,61	1,22 $\pm$ 0,05	3,7	1,20 $\pm$ 0,08	6,5	-
<b>THg</b>	2,70 $\pm$ 0,08	2,93	2,58 $\pm$ 0,05	2,1	2,54 $\pm$ 0,09	3,6	2,58 $\pm$ 0,22

#### 4.5.2 Análisis del material IAEA-086 (Pelo humano en el que el MeHg es endógeno)

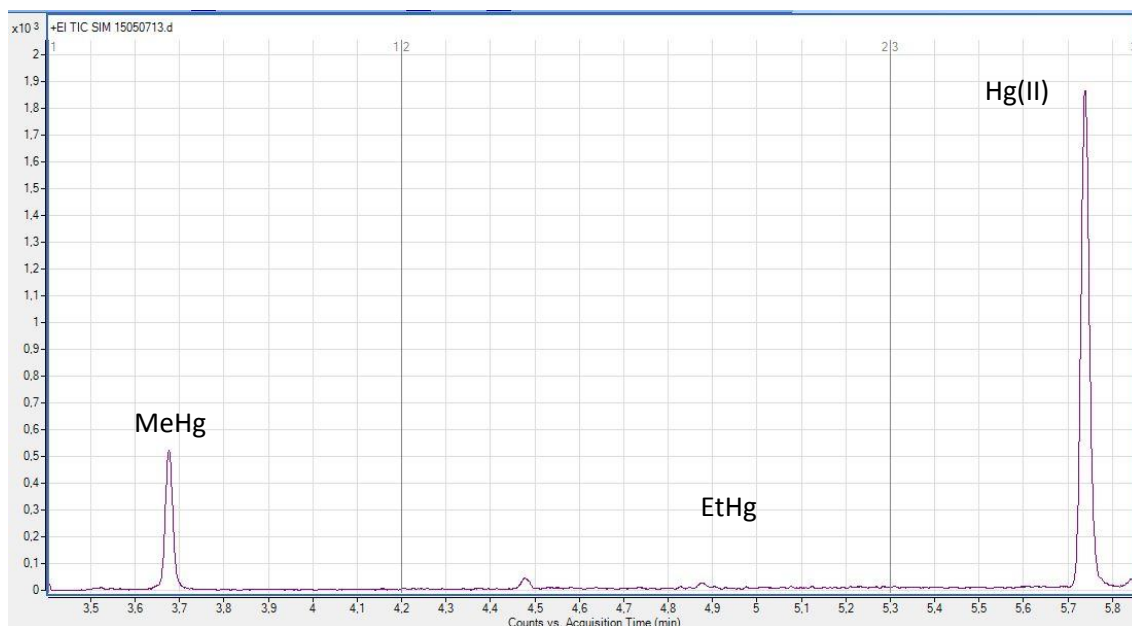
Los cromatogramas correspondientes a la separación y posterior determinación de las especies de mercurio presentes en el material IAEA-086 por GC-ICP-MS, GC-MS y GC-MS/MS se pueden apreciar en las **Figuras 17, 18 y 19**, respectivamente.



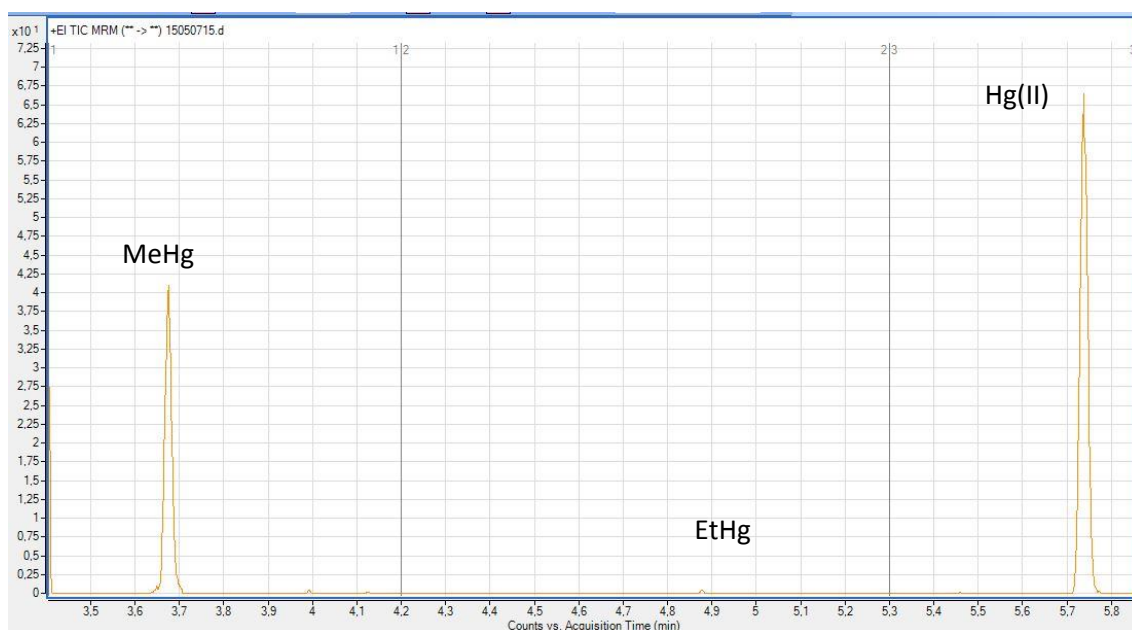
**Figura 17.** Cromatograma GC-ICP-MS de los isótopos de Hg 198, 199, 200, 201 y 202 obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material IAEA-086.



## Resultados y discusión



**Figura 18.** Cromatograma GC-MS donde se muestra la señal suma de intensidades de los distintos m/z medidas (TIC, Total Ion Count) obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material IAEA-086 obtenido en modo SIM.



**Figura 19.** Cromatograma GC-MSMS donde se muestra la suma de intensidades de las diferentes transiciones medidas obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material IAEA-086 en el modo SRM.

Al igual que el anterior material podemos observar que, al no presentar niveles apreciables de EtHg, se añadió EtHg enriquecido en una cantidad inferior a la de  $^{201}\text{MeHg}$  y  $^{199}\text{Hg}$ . En el caso

## Resultados y discusión

de los cromatogramas obtenidos en el análisis por GC-MS y GC-MS/MS observamos como en el modo SIM se consiguen unos picos con mayor intensidad, pero también con una señal de fondo mucho más alta. Sin embargo, en GC-MS/MS en modo SRM, aunque la intensidad es menor, también lo es la señal del fondo por lo que se mejora el límite de detección.

En la **Tabla 10** se muestran los resultados obtenidos con los tres espectrómetros de masas utilizados. Podemos afirmar que la cuantificación del mercurio total concuerda con el valor certificado aunque se encuentran diferencias significativas entre los valores de mercurio total obtenidos con cada equipo. En el caso de las concentraciones obtenidas para las especies de Hg no se encontraron diferencias significativas entre las tres técnicas para el MeHg y el Hg(II).

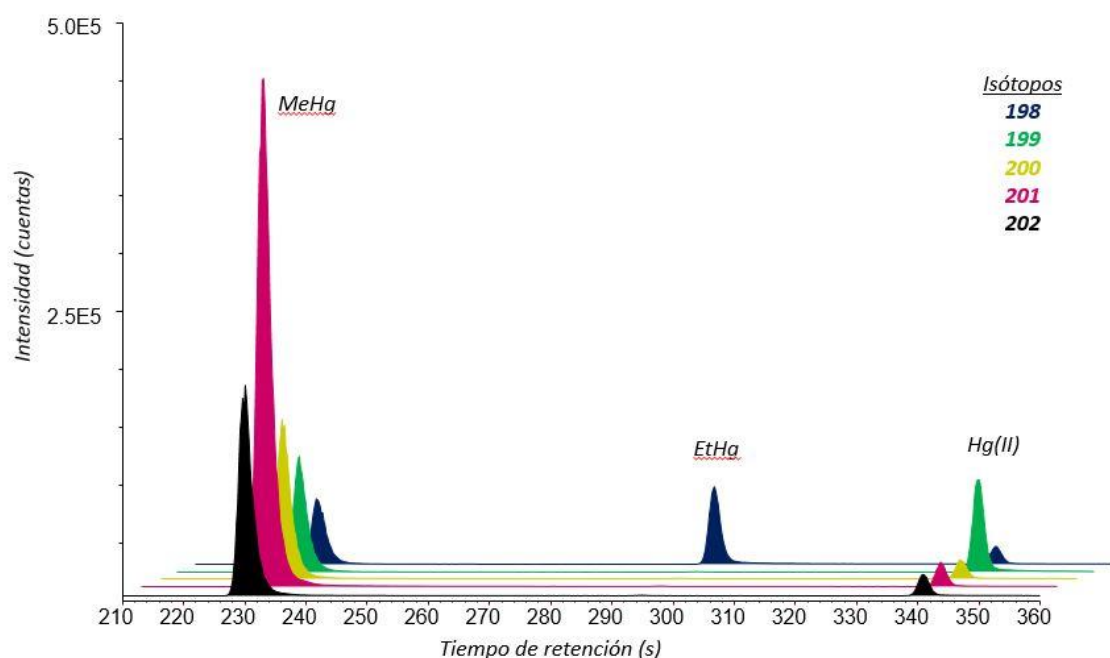
Observamos que obtenemos un precisión aceptable para todas las especies excepto para el EtHg al analizarse por GC-MS y GC-MS/MS debido a que la concentración del EtHg es muy baja en comparación con las otras especies, como en el caso del DOLT-4 y el equipo no posee suficiente sensibilidad.

**Tabla 10.** Valores de concentración obtenidos para las tres especies de mercurio y para Hg total (suma de las tres especies) en el material IAEA-086 por GC-ICP-MS, GC-MS y GC-MS/MS. La incertidumbre de los valores corresponde a la desviación estándar obtenida de n=3 extracciones independientes. La tabla muestra también los valores de la desviación estándar relativa RSD (%).

	GC-ICP-MS		GC-MS		GC-MS/MS		Valores certificados
	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD %	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD %	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD %	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
<b>MeHg</b>	0,29 $\pm$ 0,02	7,9	0,28 $\pm$ 0,00	1,1	0,30 $\pm$ 0,01	1,7	0,26 $\pm$ 0,02
<b>EtHg</b>	0,03 $\pm$ 0,00	6,6	No detectado	-	No detectado	-	-
<b>Hg (II)</b>	0,29 $\pm$ 0,02	7,4	0,28 $\pm$ 0,02	6,3	0,26 $\pm$ 0,01	4,6	-
<b>THg</b>	0,62 $\pm$ 0,03	5,1	0,56 $\pm$ 0,02	3,2	0,56 $\pm$ 0,02	2,7	0,57 $\pm$ 0,04

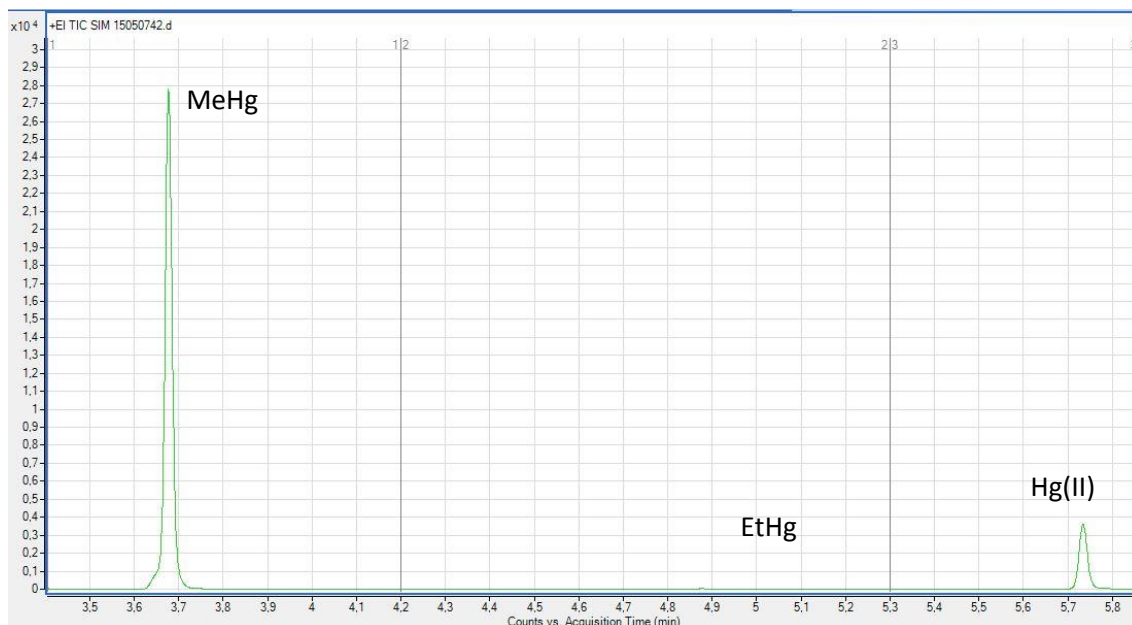
#### 4.5.3 Análisis del material IAEA-085 (Pelo humano en el que el MeHg ha sido añadido a la matriz)

Cabe resaltar que existen dos grandes diferencias entre el material IAEA-085 y el material IAEA-086. En primer lugar, el nivel de concentración de MeHg en el material IAEA-085 es 100 veces superior al del IAEA-086. La segunda diferencia entre los materiales es que en el IAEA-086 el MeHg es endógeno de la muestra mientras que en el IAEA-085 el MeHg se añadió al pelo artificialmente. Los cromatogramas correspondientes a la determinación de las especies de mercurio presentes en el material IAEA-085 llevado a cabo por GC-ICP-MS, GC-MS y GC-MS/MS se pueden observar a continuación en las **Figuras 20, 21 y 22**, respectivamente.

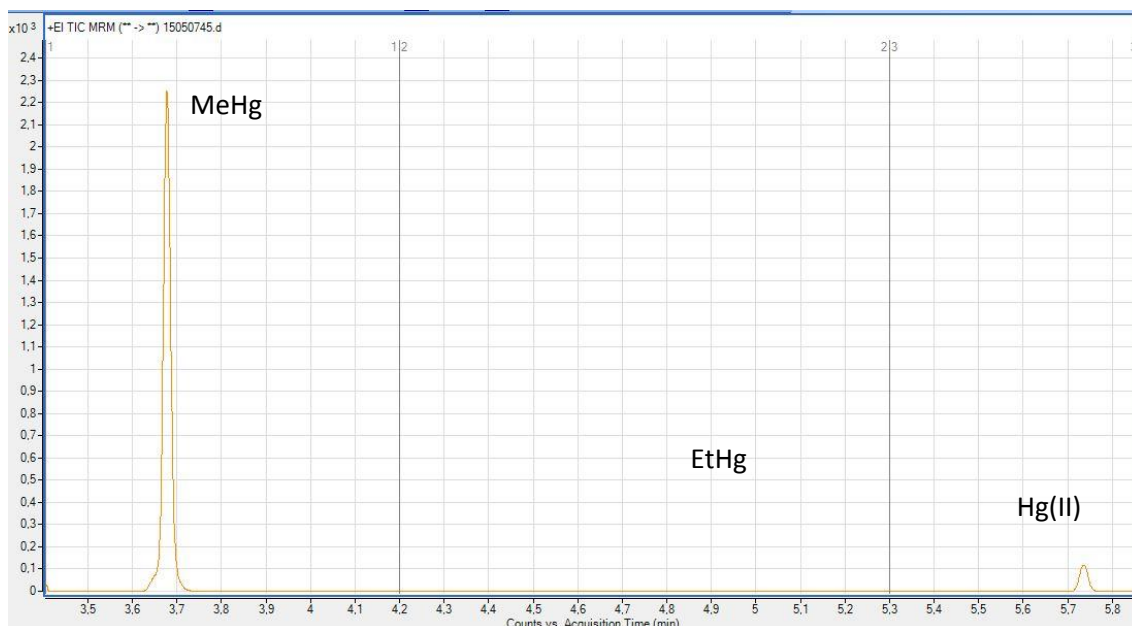


**Figura 20.** Cromatograma GC-ICP-MS de los isótopos de Hg 198, 199, 200, 201 y 202 obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material IAEA-085.

## Resultados y discusión



**Figura 21.** Cromatograma GC-MS donde se muestra la señal suma de intensidades de los distintos m/z medidas (TIC, Total Ion Count) obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material IAEA-085 obtenido en modo SIM.



**Figura 22.** Cromatograma GC-MSMS donde se muestra la suma de intensidades de las diferentes transiciones medidas obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material IAEA-085 en el modo SRM.

Observando los cromatogramas podemos concluir que tampoco en este caso hay EtHg en la muestra. En el caso del análisis por ICP-MS se detecta una pequeña concentración debido al trazador añadido, pero en el caso del análisis por GC-MS y GC-MS/MS esta ya no se puede apreciar.

## Resultados y discusión

En la **Tabla 11** se muestran los resultados obtenidos para las tres especies de Hg con los tres espectrómetros de masas utilizados. En el caso del MeHg los tres equipos proporcionan valores dentro del rango certificado. Sin embargo el resultado obtenido por GC-MS es estadísticamente diferente al obtenido por las otras dos técnicas si consideramos su desviación estándar. En el caso del EtHg, los resultados obtenidos indican que la concentración de este compuesto está cerca del límite de detección del GC-ICP-MS y del GC-MS/MS mientras que no se puede detectar mediante GC-MS en modo SIM. Respecto al THg el valor obtenido con todas las técnicas concuerda con el valor certificado.

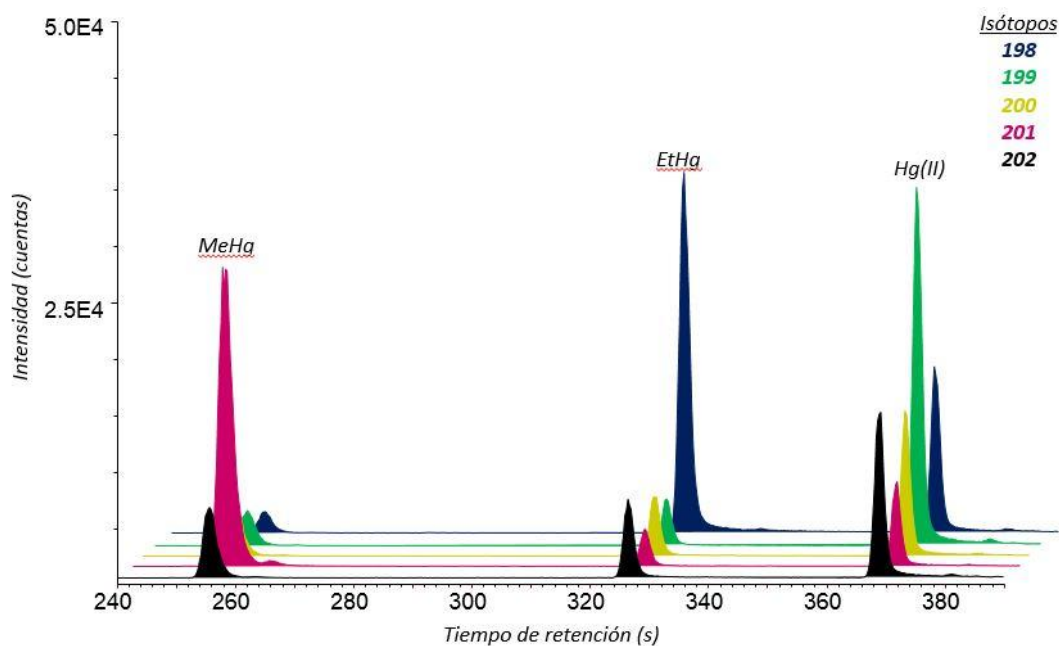
**Tabla 11.** Valores de concentración obtenidos para las tres especies de mercurio y para Hg total (suma de las tres especies en el material IAEA-085 por GC-ICP-MS, GC-MS y GC-MS/MS. La incertidumbre de los valores corresponde a la desviación estándar obtenida de n=3 inyecciones independientes. La tabla muestra también los valores de la desviación estándar relativa RSD (%).

	GC-ICP-MS		GC-MS		GC-MS/MS		Valores certificados
	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD %	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD %	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	RSD %	C ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
<b>MeHg</b>	23,35 $\pm$ 0,29	1,25	22,50 $\pm$ 0,02	0,1	23,10 $\pm$ 0,40	1,7	22,9 $\pm$ 1,00
<b>EtHg</b>	0,002 $\pm$ 0,001	44,52	No detectado	-	No detectado	-	
<b>Hg (II)</b>	0,77 $\pm$ 0,01	0,90	0,70 $\pm$ 0,02	3,1	0,73 $\pm$ 0,29	3,9	
<b>THg</b>	24,12 $\pm$ 0,29	1,21	23,20 $\pm$ 0,04	0,2	23,74 $\pm$ 0,39	1,6	23,20 $\pm$ 0,80

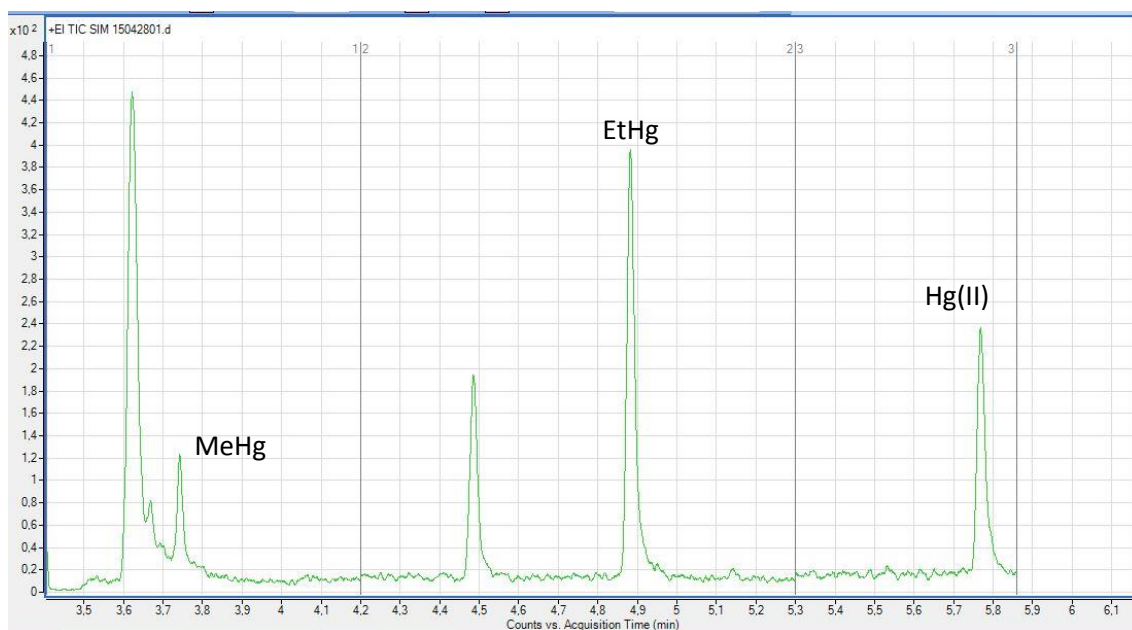
### 4.5.4 Análisis del material SRM 955c Nivel 4 (sangre de cabra)

El nivel 4 del material SRM 955c está certificado en THg, por lo que solamente se podrá utilizar este parámetro para evaluar la exactitud del método de preparación de muestra y de la determinación mediante los tres espectrómetros de masas. Los cromatogramas obtenidos para la separación y posterior determinación de las especies de mercurio en el material SRM 955c por GC-ICP-MS, GC-MS y GC-MS/MS se muestran en las **Figuras 23, 24 y 25**, respectivamente.

## Resultados y discusión

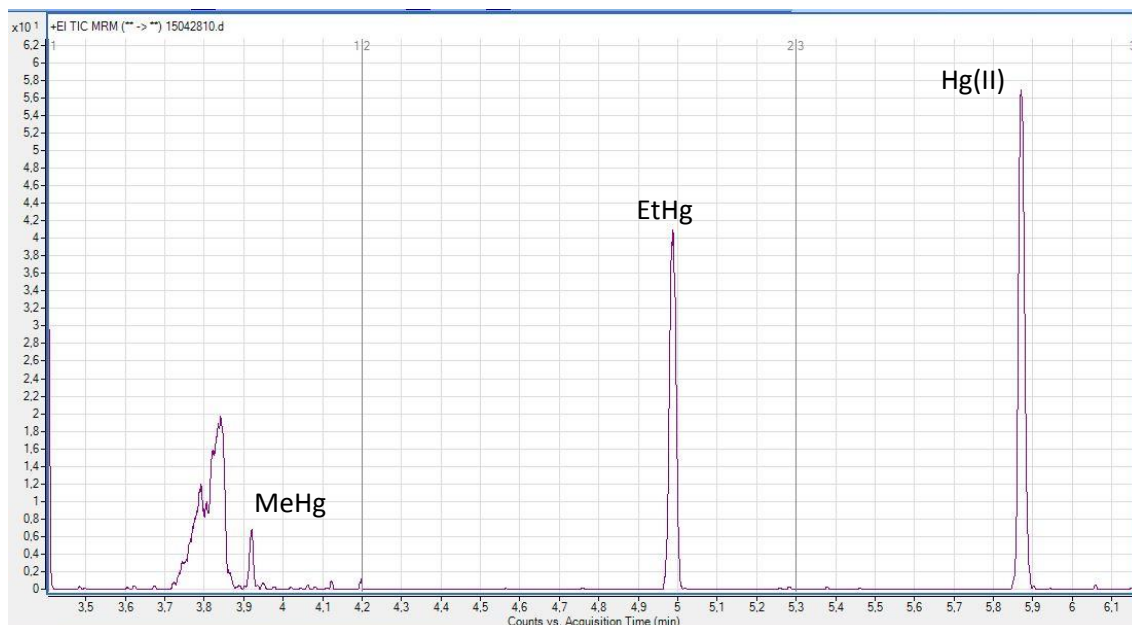


**Figura 23.** Cromatograma GC-ICP-MS de los isótopos de Hg 198, 199, 200, 201 y 202 obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material SRM 955c.



**Figura 24.** Cromatograma GC-MS donde se muestra la señal suma de intensidades de los distintos m/z medidas (TIC, Total Ion Count) obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material SRM 955c obtenido en modo SIM.

## Resultados y discusión



**Figura 25.** Cromatograma GC-MSMS donde se muestra la suma de intensidades de las diferentes transiciones medidas obtenido en el análisis de especiación de mercurio del material SRM 955c en el modo SRM.

A la vista de los cromatogramas podemos concluir que, a pesar de la complejidad que presenta la matriz de sangre, podemos separar las tres especies mediante GC-ICP-MS sin interferencias espectrales. Sin embargo, cuando analizamos esta matriz mediante GC-MS en modo SIM e incluso mediante GC-MS/MS, el perfil cromatográfico del metilmercurio se encuentra interferido. En el caso del EtHg por GC-MS se observa que en la ventana de tiempo correspondiente al etilmercurio eluye otro compuesto, sin embargo, al estar los picos perfectamente resueltos, este compuesto no nos influye ya que conocemos el tiempo de retención de nuestro compuestos cuando utilizamos estas condiciones.

En este caso, como en el análisis del IAEA-086, observamos como el cromatograma correspondiente al análisis por GC-MS proporciona una señal más intensa que en GC-MS/MS. Sin embargo, el cromatograma correspondiente al análisis por GC-MS/MS nos proporciona una señal de fondo mucho más baja que hace que la relación señal/ruido sea mejor.

La comparación de las concentraciones de las diferentes especies de mercurio obtenidas tras el análisis del SRM 955c Nivel 4 *Sangre de cabra* utilizando las tres técnicas se pueden observar en la **Tabla 12**.

Las tres técnicas de detección proporcionan un valor de THg que concuerda con el rango certificado. Sin embargo, la integración del pico de MeHg por GC-MS y GC-MS/MS es muy probable que no proporcione resultados fiables. Por esta razón los resultados más fiables

## Resultados y discusión

obtenidos en esta matriz tan complicada son los obtenidos mediante GC-ICP-MS ya que está libre de interferencias espectrales. Por ejemplo, el valor de MeHg por GC-MS difiere significativamente del obtenido por las otras dos técnicas. Cabe resaltar que este material presenta una matriz muy compleja, lo que hace que la extracción de las especies y la limpieza de las muestras sea extremadamente complicada. Esto se pone de manifiesto cuando se evalúa la incertidumbre asociada a los valores de concentración particularmente para el GC-MS y el GC-MS/MS.

**Tabla 12.** Valores de concentración obtenidos para las tres especies de mercurio y para Hg total (suma de las tres especies) en el material SRM 955c por GC-ICP-MS, GC-MS y GC-MS/MS. La incertidumbre de los valores corresponde a la desviación estándar obtenida de n=3 inyecciones independientes. La tabla muestra también los valores de la desviación estándar relativa RSD (%).

	GC-ICP-MS		GC-MS		GC-MS/MS		Valores certificados
	C (ng g <sup>-1</sup> )	RSD %	C (ng g <sup>-1</sup> )	RSD %	C (ng g <sup>-1</sup> )	RSD %	C (ng g <sup>-1</sup> )
<b>MeHg</b>	6,72 ± 0,24	3,6	10,15 ± 1,49	14,7	6,07 ± 1,32	21,7	-
<b>EtHg</b>	6,24 ± 0,28	4,0	6,64 ± 0,37	5,6	6,15 ± 2,34	38,0	-
<b>Hg (II)</b>	19,61 ± 0,54	2,7	18,97 ± 0,92	4,8	16,90 ± 0,67	3,9	-
<b>THg</b>	33,16 ± 0,65	1,96	35,76 ± 1,75	4,9	29,12 ± 2,58	8,8	32,20 ± 1,99



CONCLUSIONES

## 4. Conclusiones

A lo largo de este Trabajo Fin de Máster se ha llevado a cabo la determinación de MeHg, EtHg y Hg (II) por cromatografía de gases acoplada a tres analizadores de masas diferentes en los materiales de referencia certificados DOLT-4, IAEA-085, IAEA-086 y SRM 955c. Los resultados obtenidos han dado lugar a las siguientes conclusiones:

Los valores de concentración obtenidos para los materiales DOLT-4, IAEA-085 y IAEA-086 concuerdan con los valores certificados. Por lo tanto, el tratamiento matemático de los datos experimentales teniendo en cuenta las impurezas de los trazadores isotópicos y las posibles interconversiones entre especies es correcto.

Los análisis del material SRM 955c (sangre de cabra) mediante GC-MS y GC-MS/MS muestran problemas de interferencias espectrales en la determinación de MeHg. Por lo que la técnica GC-ICP-MS resulta la más adecuada para analizar matrices complejas como la sangre, ya que ofrece la mejor sensibilidad y está menos afectada por interferencias espectrales.

Los análisis llevados a cabo por GC-MS/MS en modo SRM son más sensibles que por GC-MS en modo SIM, ya que además de medir los iones formados en una fuente de ionización con el primer cuadrupolo, realizamos una segunda selección con el segundo cuadrupolo de los iones producto generados en la celda de colisión. De esta manera, al ser un análisis más específico, obtenemos menor señal neta pero una mayor sensibilidad al evitar interferencias.

Se ha validado el método de dilución isotópica con trazador triple y el proceso de preparación de muestra asociado ya que el método proporciona valores que concuerdan con los valores certificados de los materiales DOLT-4, IAEA-086, IAEA-085 y SRM 955c. Solamente los valores de MeHg en el material SRM 955c por GC-MS y GC-MS/MS ofrecen dudas debido a la presencia de interferencias espectrales.

## BIBLIOGRAFÍA

## 6. Bibliografía

1. P. Jitaru, F. Adams *Toxicity, sources and biogeochemical cycle of mercury* J. Phys. IV France 121 (2004) 185–193
2. P. Holmes, K.A.F. James, L.S. Levy: *Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health?*, Science of the Total Environment 408 (2009) 171–182
3. Daniel R. Engstrom *Fish respond when the mercury rises*, PNAS vol. 104 no. 42 (2007) 16394-16395
4. J. Salaramoli, N. Salamat, Sh. Najafpour, J. Hassan, T. Aliesfahani *The Determination of Total Mercury and Methyl Mercury Contents of Oily White and Light Style of Persian Gulf Tuna Cans* World Applied Sciences Journal 16 (4) (2012) 577-582
5. Thomas W. Clarkson *The Three Modern Faces of Mercury* Environmental Health Perspectives, 2002, vol. 110 sup. 1
6. Federal Public Service: Health, Food Chain Safety and Environment *DEMOCOPHES: Human biomonitoring on a European scale*
7. László Abrankó, Zsuzsa Jókai Péter Fodor *Investigation of the species specific degradation behaviour of methylmercury and ethylmercury under microwave irradiation* Anal Bioanal Chem 383 (2005) 448–453
8. Laure Laffont, Laurence Maurice, David Amouroux, Patricia Navarro, Mathilde Monperrus, Jeroen E. Sonke & Philippe Behra *Mercury speciation analysis in human hair by species-specific isotope-dilution using GC–ICP–MS* Anal Bioanal Chem (2012)
9. Jaime Pacheco-Arjona, Pablo Rodriguez-Gonzalez, Manuel Valiente, David Barclay, Olivier 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 environmental matrices* International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 88(13) (2008) 923-932
10. Brian Jackson, Vivien Taylor, R. Arthur Baker, Eric Miller *Low level mercury speciation in freshwaters by isotope dilution GC-ICP-MS* Environ Sci Technol. 43(7) Abril (2009) 2463–2469.
11. J.L. Gómez-Ariza F. Lorenzo, T. García-Barrera *Guidelines for routine mercury speciation analysis in seafood by gas chromatography coupled to a home-modified AFS detector. Application to the Andalusian coast (south Spain)* Chemosphere 61 (2005) 1401–1409

## Bibliografía

12. Vivien F. Taylor, Annie Carter, Colin Davies, Brian P. Jackson *Trace-Level Automated Mercury Speciation Analysis* Anal Methods. 3(5) (2011) 1143–1148.
13. Marika Berglund, Birger Lind, Karolin Ask Björnberg, Brita Palm, Östen Einarsson, Marie Vahter *Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment* Environmental Health: A Global Access Science Source 4(20) (2005)
14. W. Clay. Davis, Stephen E. Long *Measurements of methylmercury, ethylmercury, and inorganic mercury species in a whole blood standard reference material: SRM 955c—Toxic Elements in Caprine Blood* J. Anal. At. Spectrom., (26) (2011) 431–435
15. Ying Gao, Zeming Shi, Zhou Long, Peng Wu, Chengbin Zheng, Xiandeng Hou *Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry* Microchemical Journal 103 (2012) 1–14
16. Ángel Castillo, Pablo Rodríguez-González, Giuseppe Centineo, Antoni Francesc Roig-Navarro, and J. Ignacio García Alonso *Multiple Spiking Species-Specific Isotope Dilution Analysis by Molecular Mass Spectrometry: Simultaneous Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Fish Tissues* Anal. Chem. (82) (2010) 2773–2783
17. Solomon Tesfalidet *Determination of Organometallic Compounds Using Species Specific Isotope Dilution and GC-ICP-MS* Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications (2012)
18. 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
19. C. Cámara, C. Pérez-Conde *Análisis químico de trazas* Ed. Síntesis
20. García Alonso, J.I. y Rodríguez-González, P. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*, The Royal Society of Chemistry (2013)
21. Pablo Rodríguez-González, Jorge Ruiz Encinar, J. Ignacio García Alonso and Alfredo Sanz-Medel *Development of a triple spike methodology for validation of butyltin compounds speciation analysis by isotope dilution mass spectrometry* J. Anal. At. Spectrom., 19 (2004) 685-691
22. Pablo Rodríguez-González, Mathilde Monperrus, J. I. García Alonso, David Amouroux, Olivier 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* J. Anal. At. Spectrom., 22 (2007) 1373–1382
23. Pablo Rodríguez-González, Juan Manuel Marchante-Gayón, J. Ignacio García Alonso, Alfredo Sanz-Medel *Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review* Spectrochimica Acta Part B 60 (2005) 151– 207