



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Departamento de Química Física y Analítica

Programa de Doctorado de Análisis Químico, Bioquímico y
Estructural y Modelización Computacional

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y EL
FRACCIONAMIENTO ISOTÓPICO DE ESPECIES DE
MERCURIO EN MUESTRAS BIOLÓGICAS MEDIANTE
EL ACOPLAMIENTO DE LA CROMATOGRAFÍA DE
GASES A DISTINTOS ESPECTRÓMETROS DE MASAS

TESIS DOCTORAL

Silvia Queipo Abad

Oviedo, 2019



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Determinación de la concentración y el fraccionamiento isotópico de especies de mercurio en muestras biológicas mediante el acoplamiento de la cromatografía de gases a distintos espectrómetros de masas	Inglés: Determination of the concentration and isotopic fractionation of mercury species in biological samples by gas chromatography coupled to different mass spectrometers
2.- Autor	
Nombre: Silvia Queipo Abad	DNI/Pasaporte/NIE: -S
Programa de Doctorado: Programa de Doctorado de Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional	
Órgano responsable: Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo	

RESUMEN (en español)

El ciclo biogeoquímico del mercurio en el medio ambiente ha recibido considerable atención en las últimas décadas. Los niveles de Hg en la atmósfera siguen aumentando por emisiones naturales, pero especialmente por emisiones antropogénicas, como la quema de combustibles fósiles o la minería de oro artesanal. La transferencia de Hg dentro del ciclo biogeoquímico depende en gran medida de la forma química en que se encuentre. El Hg(II) depositado se transforma en MeHg en el medio acuático, el cual es bioacumulado y biomagnificado a través de la cadena trófica. Los seres humanos están expuestos a este compuesto tóxico debido al consumo de pescado. Además, la exposición ocupacional a mercurio a nivel industrial también requiere de un control. Las agencias de Naciones Unidas, OMS y PNUMA han desarrollado una guía para identificar individuos expuestos a través de concentraciones en sangre, orina y pelo. La complejidad de las muestras y los bajos niveles de concentración en los que se encuentran los compuestos de interés, hace que se utilicen tratamientos de muestra largos y complicados que pueden introducir errores en el resultado final.

Por otro lado, el estudio de la biogeoquímica de isótopos estables de Hg se considera una herramienta con un gran potencial para trazar el ciclo del Hg y elucidar las diferentes vías de transformación de este elemento en el medio ambiente. Se sabe que la especiación tiene una gran importancia en la movilidad o en la bioacumulación del Hg. Sin embargo, la mayoría de los estudios de fraccionamiento isotópico se basan en el análisis total de Hg y no en su especiación. La composición isotópica del MeHg sólo se ha evaluado en materiales que se espera que contengan una proporción muy elevada de MeHg en comparación con las demás especies, como es el pescado. El fraccionamiento isotópico del MeHg tiene un gran interés toxicológico ya que aún se desconocen los mecanismos y las vías por las que se origina a nivel medioambiental.



Por todo lo dicho anteriormente, la presente Tesis Doctoral desarrolla metodologías analíticas para la determinación de la concentración y el fraccionamiento isotópico de especies de mercurio en muestras biológicas mediante el acoplamiento de la Cromatografía de Gases a distintos espectrómetros de masas. Para ello se han desarrollado y evaluado metodologías de análisis por dilución isotópica con múltiple trazador específico de las especies de Hg, en concentraciones en el rango de ng g⁻¹. Esta metodología desarrollada ha sido aplicada a muestras humanas con el objetivo de determinar las concentraciones de las especies de Hg en sangre, orina y pelo. En el caso del estudio del fraccionamiento isotópico se ha desarrollado una metodología para la medida precisa y exacta de relaciones isotópicas específicas del compuesto en muestras biológicas. Además, se ha desarrollado otra metodología de alta sensibilidad para la medida exacta y precisa de relaciones isotópicas del C del MeHg. Los resultados que permitiría obtener esta metodología centrada en el MeHg, pueden aportar información muy valiosa acerca del origen y transformaciones que experimentan dicha especie química.

RESUMEN (en Inglés)

The biogeochemical cycle of mercury in the environment has received considerable attention in recent decades. The levels of Hg in the atmosphere are increasing continuously by natural emissions, but especially by anthropogenic emissions, such as the fossil fuels burning or artisanal gold mining activities. The transfer of Hg within the biogeochemical cycle depends on its chemical form. The deposited Hg (II) is transformed into MeHg in the aquatic environment, which is bioaccumulated and biomagnified through the trophic chain. Humans are exposed to this toxic compound by consumption of fish. In addition, occupational exposure to mercury at the industrial level also requires control of Hg levels in the body. United Nations, WHO and UNEP agencies have developed a guide to identify individuals exposed to mercury through concentrations in blood, urine and hair. The complexity of the samples and the low levels of concentration in which the compounds of interest are found, require long and complicated sample preparation procedures which can introduce errors in the final result.

On the other hand, the study of the biogeochemistry of stable isotopes of Hg is considered a powerful tool to trace the Hg cycle and elucidate the different ways of transformation of this element in the environment. It is known that speciation has a great importance in the mobility or bioaccumulation of Hg. However, most isotopic fractionation studies are based on total Hg analysis and not on speciation analysis. The isotopic composition of MeHg has been evaluated in materials that are expected to contain a higher proportion of MeHg compared to other species, such as fish samples. The isotopic fractionation of MeHg has a great toxicological interest since the mechanisms and the ways in which it originates at an environmental level are still unknown.

In this context, this Doctoral Thesis focused on the development of analytical methodologies



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

for the determination of the concentration and isotopic fractionation of mercury species in biological samples by coupling Gas Chromatography to different mass spectrometers. To this aim, multiple spiking species-specific isotope dilution methodologies have been developed and evaluated, for Hg species concentrations in the range of ng g⁻¹. This developed methodology has been applied to human samples in order to determine the concentrations of Hg species in blood, urine and hair. In the case of the study of isotopic fractionation, a methodology has been developed for the accurate and precise measurement of compound specific isotopic ratios of Hg in biological samples. In addition, another high-sensitivity methodology has been developed for the accurate and precise measurement of isotopic ratios for the C of the MeHg. The results obtained from this methodology, can provide valuable information about the origin and transformations of MeHg.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN ANÁLISIS QUÍMICO, BIOQUÍMICO Y ESTRUCTURAL Y MODELIZACIÓN
COMPUTACIONAL.**



FORMULARIO RESUMEN DE TESIS POR COMPENDIO

1.- Datos personales solicitante	
Apellidos: Queipo Abad	Nombre: Silvia

Curso de inicio de los estudios de doctorado	2016/2017
--	-----------

	SI	NO
Acompaña acreditación por el Director de la Tesis de la aportación significativa del doctorando	X	

Acompaña memoria que incluye

Introducción justificativa de la unidad temática y objetivos	X	
Copia completa de los trabajos *	X	
Resultados/discusión y conclusiones	X	
Informe con el factor de impacto de la publicaciones	X	

Se acompaña aceptación de todos y cada uno de los coautores a presentar el trabajo como tesis por compendio	X	
Se acompaña renuncia de todos y cada uno de los coautores a presentar el trabajo como parte de otra tesis de compendio	X	

* Ha de constar el nombre y adscripción del autor y de todos los coautores así como la referencia completa de la revista o editorial en la que los trabajos hayan sido publicados o aceptados en cuyo caso se aportará justificante de la aceptación por parte de la revista o editorial

FOR-MAT-VOA-033

Artículos, Capítulos, Trabajos

Development of a Common Procedure for the Determination of Methylmercury, Ethylmercury, and Inorganic Mercury in Human Whole Blood, Hair, and Urine by Triple Spike Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry

Titulo (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Analytical Chemistry
12/05/2017
12/05/2017
Sí
6.042 (2017)

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Pablo Rodríguez González
W. Clay Davis
José Ignacio García Alonso



Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor4 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor5 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Certification of Mercury and Tin Species in Fresh Frozen SRM 1974c (MYTILUS EDULIS)

Analytical and Bioanalytical Chemistry
-
Enviado
Sí
3.307 (2017)

Pablo Rodríguez González
José Ignacio García Alonso
W. Clay Davis

Evidence of the direct adsorption of mercury in human hair during occupational exposure to mercury vapour.

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology
07/2016
22/03/2016
Sí
3.755 (2017)

Pablo Rodríguez González
José Ignacio García Alonso

Concentration of mercury species in hair, blood and urine of individuals occupationally exposed to gaseous elemental mercury in Asturias (Spain) and its comparison with individuals from a control group formed by close relatives.

Science of the Total Environment
31/03/2019
23/03/2019
Sí
4.610 (2017)

Pablo Rodríguez González
Eduardo Martínez Morillo
W. Clay Davis
José Ignacio García Alonso



Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Coautor2 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Measurement of compound-specific Hg isotopic composition in narrow transient signals by gas chromatography coupled to multicollector ICP-MS

Journal of Analytical Atomic Spectrometry
19/03/2019
19/03/2019
Sí
3.608 (2017)

Pablo Rodríguez González
José Ignacio García Alonso

Título (o título abreviado)
Fecha de publicación
Fecha de aceptación
Inclusión en Science Citation Index o bases relacionadas por la CNEAI (indíquese)
Factor de impacto

Coautor2 <input type="checkbox"/> Doctor <input checked="" type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos
Coautor3 <input checked="" type="checkbox"/> Doctor <input type="checkbox"/> No doctor . Indique nombre y apellidos

Sensitive determination of methylmercury $\delta^{13}\text{C}$ compound specific stable isotopic analysis by purge and trap gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (PT-GC-C-IRMS)

Journal of Chromatography A
-
Enviado
Sí
3.716 (2017)

Christelle Lagane
David Point

En caso de compendio de un número de artículos superior a seis, se incorporarán hojas suplementarias conforme a este modelo

Contenido

A.	Introducción general	13
A.1.	El Mercurio.....	15
A.1.1.	Antecedentes históricos de exposición humana a mercurio.	15
A.1.2.	Las especies químicas de mercurio	20
A.1.3.	Aplicaciones de las especies químicas de mercurio	25
A.1.4.	Emisiones de las especies químicas de Hg	29
A.1.5.	Ciclo biogeoquímico.....	31
A.1.6.	Toxicocinética y toxicodinámica de las especies químicas de Hg	36
A.1.7.	Legislación sobre compuestos de mercurio	42
A.2.	Medida de relaciones isotópicas mediante espectrometría de masas.....	47
A.2.1.	Espectrometría de masas.....	47
A.2.2.	Fuentes de ionización	49
A.2.3.	Analizadores de masas	57
A.2.4.	Detectores de iones	63
A.3.	Acoplamiento de la cromatografía de gases a la espectrometría de masas	67
A.3.1.	Cromatografía de gases	67
A.3.2.	Acoplamiento GC-EI-MS	68
A.3.3.	Acoplamiento de la cromatografía de gases al ICP-MS.....	69
A.4.	Análisis por Dilución isotópica	73
A.4.1.	Concepto de dilución isotópica	73
A.4.2.	Análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas	74
A.4.3.	Ecuación clásica de la dilución isotópica.....	78
A.4.4.	Deconvolución de perfiles isotópicos.....	82
A.4.5.	Análisis por dilución isotópica específica de especies con múltiples trazadores enriquecidos	84
A.5.	Variaciones naturales de la composición isotópica de los elementos.....	87
A.5.1.	Fraccionamiento isotópico de isótopos estables.	87
A.5.2.	Fraccionamiento isotópico del C.....	88
A.5.2.	Fraccionamiento isotópico dependiente de la masa	90
A.5.3.	Fraccionamiento isotópico independiente de la masa.....	94
A.5.4.	Variabilidad isotópica natural de Hg	97
B.	Objetivos	105
C.	Experimental	113
C.1.	Instrumentación	115
C.1.1.	Cromatógrafo de gases	115
C.1.2.	ICP-MS de tipo cuadrupolo	117
C.1.3.	ICP-MS de doble enfoque tipo multicollector	119
C.1.4.	GC-IRMS	123
C.1.5.	Sistema de purga y trampa	126

C.1.6. LA-ICP-MS	128
C.1.7. Otra instrumentación.....	131
C.2. Materiales y reactivos	133
C.2.1. Patrones enriquecidos isotópicamente y de abundancia natural	133
C.2.2. Materiales de referencia	133
C.2.3. Reactivos generales	134
C.2.4. Material de laboratorio	135
C.2.5. Recogida de muestras reales	135
C.3. Preparación de muestras.....	137
C.3.1. Procedimiento de preparación de muestras para análisis por IDMS	137
C.3.2. Preparación de muestras para medidas de relaciones isotópicas.....	139
C.3.3. Preparación de muestras de pelo para ablación láser	141
C.3.4. Digestión de muestras de pelo tras ablación láser.....	142
C.4. Especiación de Hg por IDMS con múltiples trazadores	143
C.4.1 Medida de las abundancias isotópicas por GC-ICP-Q-MS	143
C.4.2. Caracterización de disoluciones enriquecidas	143
C.4.3. Cálculo matemático para IDMS con trazador triple	145
C.4.4. Corrección de la discriminación de masas	147
C.4.5. Cálculo de concentraciones de butilestaño por dilución isotópica	148
C.5. Determinación de relaciones isotópicas de Hg	149
C.5.1. Medida de las abundancias isotópicas por GC-MC-ICP-MS.....	149
C.5.2 Cálculo de valores delta de Hg ($\delta^{xxx}\text{Hg}$ y $\Delta^{xxx}\text{Hg}$).....	149
C.6. Determinación de $\delta^{13}\text{C}$ para el metilmercurio (CH_3Hg)	158
C.6.1. Procedimiento para la medida de $\delta^{13}\text{C}$ por PT-GC-IRMS.....	158
C.6.2. Cálculo de las relaciones isotópicas relativas ($\delta^{13}\text{C}$) de CH_3Hg	159
C.6.3. Corrección de la contribución del contenido de C del derivatizante.....	160
C.7. Medida $^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$ en muestras de pelo por ablación láser	162
D. Resultados	165
D.1. Determinación de especies de mercurio en muestras biológicas por análisis de dilución isotópica con múltiples trazadores.....	167
D.1.1. Introducción	169
D.1.2. Objetivos	172
D.1.3. Artículo Científico I.....	173
D.1.4. Artículo Científico II.....	217
D.2. Medida de especies de Hg en muestras humanas y estudio de la distribución de dichas especies en el organismo.....	231
D.2.1. Introducción	233
D.2.2. Objetivos	236
D.2.3. Artículo Científico III.....	237
D.2.1. Artículo Científico IV	251

D.3. Desarrollo de una metodología para la medida precisa y exacta de relaciones isotópicas específicas del compuesto en muestras biológicas	281
D.3.1. Introducción	283
D.3.2. Objetivos	285
D.3.3. Artículo Científico V	286
D.4. Desarrollo de una metodología para la medida exacta y precisa de relaciones isotópicas del C del CH ₃ Hg.	319
D.4.1. Introducción	321
D.4.2. Objetivos	323
D.4.3. Artículo Científico VI	324
E. Discusión integradora	353
F. Conclusiones	379
F1. Conclusiones (ESP)	381
F2. Conclusions (ENG)	385
G. Factor de impacto	389
G.1. Factor de impacto de las publicaciones presentadas.	391
H. Referencias bibliográficas.....	395

Lista de Abreviaturas (A-Z)

B	Campo magnético
BA	Quelante <i>British Anti Lewisite</i>
BAT	Índice de Tolerancia Biológica (Biologischer Arbeitsstoff-Toleranzwert)
BEI	Índices Biológicos de Exposición
BTEX	Compuestos orgánicos (Benceno, Tolueno, Etilbenceno, o,m,p-Xyleno)
CA	Anhidrasa carbónica
CCD	Dispositivo de Carga Acoplada
CCQM	Comité Consultivo para la Cantidad de la Materia
CE	Comunidad Europea
C-IRMS	Combustión acoplado a MS de relaciones isotópicas
CRM	Material de Referencia Certificado
CSIA	Análisis Isotópico Específico del Compuesto
CSV	Formato de archivo Excel (<i>Comma-Separated Values</i>)
CV	Vapor frío (<i>Cold vapor</i>)
DBT	Dibutilestaño
DC	Corriente Directa
DMPS	2,3-Dimercaptopropano-1-sulfonato
DMSA	Ácido 2,3-dimercaptosuccínico
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
EI	Ionización Electrónica
EPA	Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos
ESA	Campo electrostático
ESI	Fuente de ionización de Electrospray
EtHg	Etilmercurio
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
FeRB	Bacterias reductoras de hierro
GC	Cromatografía de Gases
GSH	Glutatión
HBM	Índices de Biomonitorización Humana
Hg	Mercurio
Hg(0), Hg	Mercurio elemental

Lista de abreviaturas (A-Z)

Hg(0) _v	Mercurio elemental en estado vapor
Hg(II), Hg ²⁺	Mercurio inorgánico
Hg ₂ ²⁺	Ion mercurioso
HgT	Mercurio total
IAEA	Agencia Internacional de Energía Atómica
ICMGP	Conferencia Internacional sobre Mercurio como Contaminante Global
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo
ID	Dilución Isotópica
IDMS	Dilución isotópica y Espectrometría de Masas
INSHBT	Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo
IPD	Deconvolución de Perfiles Isotópicos
IRMS	Espectrometría de Masas de Relaciones Isotópicas
JECFA	Comité de Expertos FAO/OMS para Aditivos Alimentarios
LA	Ablación Láser
LAT	Transportadores de aminoácidos neutros tipo L
L-Cys	L-Cisteína
LI	Inyección líquida
L-Met	L-Metionina
LN ₂	N ₂ líquido
LOAEL	Nivel más bajo que muestra efecto adverso
LRS	Método de cálculo basado en la pendiente de la recta de regresión lineal (<i>Linear Regression Slope</i>)
m/z	Relación masa/carga- Masa nominal
MBT	Monobutilestaño
MC	Multicolector
MDF	Fraccionamiento isotópico dependiente de la masa
Me ₂ Hg	Dimetilmercurio
MeHg	Metilmercurio
MIE	Efecto Magnético Isotópico
MIF	Fraccionamiento isotópico independiente de la masa
MW	Microondas
NFS	Distorsión de Campo Nuclear (<i>Nuclear Field Shift</i>)
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de Estados Unidos
NOAEL	Nivel que no muestra efecto adverso

NRCNational Research Council (Canadá)
NVEEfecto de Volumen Nuclear
OMSOrganización Mundial de la Salud
ONUOrganización de Naciones Unidas
ORSOctapole Reaction System
PAIMétodo de cálculo basado en integración del área de pico (Peak Area Integration)
PbPMétodo de cálculo de la relación isotópica punto a punto (Point by Point)
PFAPerfluoroalcoxi
PhHgFenilmercurio
PNUMAPrograma de Naciones Unidas para el Medio Ambiente
PTPurga y Trampa
PTFEPolitetrafluoroetileno
PTVSistema de vaporización con temperatura programable
PTWIValor provisional de la ingesta semanal tolerable
PVCCloruro de polivinilo
PWTTrampa de agua (<i>Peltier Water Trap</i>)
QCuadrupolo
RAEEsResiduos de aparatos eléctricos y electrónicos
RFRadiofrecuencias
ROSEspecies reactivas de oxígeno
RSDDesviación Estándar Relativa
SDDesviación estándar
SeHGrupo selenol
SEMSecondary electron multiplier
SFSector Field
SHGrupo tiol
SPEExtracción en Fase Sólida
SRBBacterias reductoras de sulfato
SRMMaterial Estándar de Referencia
SSEEfecto de auto-blindaje
TBTTributilestaño
TMAHHidróxido de Tetrametilamonio
TOFAnalizador de masas de Tiempo de vuelo
TRAAnálisis de tiempo resuelto

Lista de abreviaturas (A-Z)

UE	Unión Europea
VOC	Compuestos orgánicos volátiles
YAG	Granate de itrio y aluminio

A. Introducción general

A.1. El Mercurio

El mercurio (Hg) es uno de los metales pesados que despierta un mayor interés en la sociedad actual. Sus efectos neurotóxicos en los organismos, ligado a su amplia presencia medioambiental, hacen que haya sido catalogado como una de las diez sustancias químicas de mayor concienciación pública según la Organización Mundial de la Salud (OMS). El mercurio es un elemento que se encuentra en la corteza terrestre, y es liberado a la atmósfera a través de fuentes naturales, como es el caso de los volcanes o los procesos erosivos. Sin embargo, las fuentes antropogénicas, es decir, la acción humana, son el principal causante de la liberación de mercurio a nivel atmosférico. La quema de combustibles fósiles, la minería artesanal o la industria cloro-álcali han sido hasta nuestros días, fuentes de liberación de grandes cantidades de mercurio al medio ambiente. Además, el mercurio ha sido un elemento ampliamente utilizado, debido a sus características fisicoquímicas, a lo largo de la historia. Todo ello ha contribuido a que grandes cantidades de mercurio se encuentren en la atmósfera, formando parte de un ciclo biogeoquímico de transformaciones, en el que coexisten distintos estados de oxidación del elemento, así como diferentes especies químicas. Cada una de estas especies químicas presenta unas características que determinan sus efectos sobre los seres vivos y el medio ambiente. Los trabajos recogidos en la presente tesis doctoral tienen como objeto la determinación y el estudio del origen de las especies químicas de mercurio en matrices biológicas. En este apartado se realizará una amplia descripción del papel de las especies de mercurio tanto en el medio ambiente como en el organismo humano. Esta descripción permitirá comprender cuáles son las causas que han llevado al mercurio a ser uno de los principales contaminantes a nivel global.

A.1.1. Antecedentes históricos de exposición humana a mercurio.

El mercurio fue un elemento muy empleado y apreciado en muchas de las antiguas civilizaciones. En general se le atribuían poderes curativos y místicos que se debían a sus peculiaridades fisicoquímicas: metal de color plateado, líquido a temperatura ambiente y con una alta densidad. Los alquimistas hindúes creían que el oro, la plata, el cobre, el estaño, el plomo y

el hierro eran una mezcla del mercurio con otras sustancias. Los griegos lo llamaron *hidro argiros*, cuyo significado es, plata líquida, de donde deriva su nombre latino *hydrargyrum*, como lo conocían los romanos y también el término inglés *quicksilver*. Sin embargo, el nombre más empleado universalmente, y que define al elemento en la tabla periódica, es el del dios romano Mercurio. Este dios estaba asociado al comercio, lo que refleja la importancia que se otorgaba al mercurio y a su minería en la economía romana.

Las Minas de Almadén son los mayores depósitos de cinabrio del planeta, que es la principal fuente mineral de mercurio (Figura A.1). Estas minas datan de unos 2500 años de antigüedad, convirtiéndose durante 500 años en la mina de cinabrio más importante a nivel mundial junto con las de Idrija (Eslovenia).¹ El historiador griego Teophrasto ya hablaba del cinabrio procedente de Hispania en un texto del año 300 a.C.² Posteriormente el escritor romano Plinio (23-79 a.C.) ya mencionaba en otro documento la explotación en las minas de Almadén.³ En él también desvelaba que los romanos conocían el efecto toxicológico de la inhalación del mercurio vapor. Esto se refleja en la denominación “Enfermedad del esclavo” para referirse a la intoxicación por mercurio, ya que eran los esclavos quienes trabajaban las minas.⁴



Figura A.1. Horno de aludeles en las Minas de Almadén (Ciudad Real, España)

A pesar de la explotación romana, fueron los árabes quienes bautizaron el yacimiento como Almadén (*Al-madin*, la mina). Éstos denominaban al mercurio “*azogue*”, que en su idioma significa correr, término que aún perdura en el lenguaje. Los médicos árabes empleaban con frecuencia el mercurio con fines terapéuticos. Una de las leyendas más llamativas al respecto del Hg data de la época de Abderramán III, emir de Córdoba (891-961 d.C) en la mezquita de Medina Azahara, quien mandó construir una fuente de mercurio para impresionar a sus visitantes.⁵

El filósofo griego Aristóteles (siglo IV a.C.) fue uno de los primeros en detallar el uso del mercurio en ceremonias religiosas.⁶ También en China y el Tíbet, se le atribuían propiedades místicas, como por ejemplo que su ingesta prolongaba la vida. El primer emperador de China, Qin Shi Huang, se hizo enterrar en uno de los mayores mausoleos de la historia, donde se cree que se introdujeron grandes cantidades de mercurio para simular los ríos, mares y lagos de su imperio.⁷ Lo más curioso, es que el propio emperador murió envenenado por mercurio intentando prolongar su vida. En el año 2014, también se descubrió mercurio en una cámara del Templo Quetzalcóatl en Teotihuacán (México), que tiene unos 1800 años de antigüedad. El mercurio por sus características ha estado ligado durante siglos a la historia de la ciencia y la medicina. Muchos de los experimentos desarrollados en los siglos XVIII y XIX emplearon este elemento tanto como producto o como parte la instrumentación. El químico francés Antoine Laurent de Lavoisier, lo identificó como elemento durante sus investigaciones sobre la composición del aire.⁸ Por primera vez, en 1643, Evangelista Torricelli, utilizó Hg líquido en un barómetro. Posteriormente, en 1724, Daniel Gabriel Fahrenheit, desarrolló el termómetro con mercurio.⁹ A partir de ahí se fue empleado en la fabricación de otros instrumentos de medida como tensiómetros o manómetros. También cabe destacar que, en 1774, Joseph Priestley descubrió el oxígeno en un experimento calentando óxido de mercurio y recogiendo el gas desprendido.

Entre los usos más antiguos del mercurio encontramos la aplicación directa de su principal mena, el cinabrio (HgS) como pigmento rojo bermellón, que fue muy apreciado en las antiguas culturas. Se han encontrado restos de este mineral en piezas ornamentales de la antigua China, manuscritos con tinta roja y también en restos arqueológicos de culturas precolombinas.¹⁰⁻¹²

Muchos pintores conocidos como Da Vinci, Botticelli, Rubens, Rembrandt, Goya o Monet también emplearon estos pigmentos con Hg en sus obras.¹³ Por ejemplo, el pigmento empleado en la Gioconda está constituido por un 99% de plomo blanco y un 1% HgS. El uso en pinturas se extendió también a los compuestos orgánicos de mercurio, pero en este caso con el objetivo de que desarrollasen una acción fungicida, entre ellos los de fenilmercurio (PhHg). En la isla de Murano (Venecia), se creó en 1507 la primera fábrica donde se empleaba una amalgama de mercurio líquido y estaño, en la producción de espejos.¹⁴ Estos espejos eran muy apreciados por su brillo característico y pronto se extendió su comercialización.

El interés en la utilización del mercurio ha provocado diversos casos de intoxicaciones a lo largo de la historia. Como se ha mencionado previamente, en las antiguas explotaciones de mercurio, los efectos de la intoxicación en los mineros eran conocidos como la “Enfermedad del esclavo”. Otro caso de intoxicación se produjo en la construcción de la gran estatua de Buda, (Nara, Japón), terminada en el año 752. En esta obra, el mercurio se empleó en amalgama con oro y estaño para cubrir dicha estatua y esto provocó la intoxicación de los trabajadores.⁴ Un caso muy conocido es el hidrargirismo que padecían los fabricantes de sombreros británicos (siglo XIX), que realizaban el curtido de las pieles con nitrato de mercurio $[Hg(NO_3)_2]$. Los vapores liberados en el proceso causaban en éstos problemas neuronales, que derivaban en actitudes histriónicas y temblores.¹⁵ Este problema de salud, se conocía como la “Enfermedad del sombrerero loco”, la cual visibilizó Lewis Carroll, llevándola a la ficción en su obra más famosa, *Alicia en el País de las Maravillas*, ilustrada en la Figura A.2.



Figura A.2. Ilustración clásica de *Alice in Wonderland* creada por Lewis Carroll en 1865.

En los años 50 surge una mayor concienciación sobre los efectos nocivos del mercurio para la salud. Es en esa década cuando se produce el mayor caso de intoxicación por mercurio en la historia contemporánea. Cientos de pescadores y sus familias, que habitaban en la Bahía de Minamata, fueron intoxicados con mercurio debido al consumo de pescado contaminado. La contaminación fue provocada por un vertido industrial de Hg inorgánico, que se transformó en metilmercurio (MeHg) en la propia bahía y se bioacumuló en los peces. Las consecuencias fueron que, en torno a unas 3000 personas sufrieron daños neurológicos. Pero la peor parte se la llevaron los niños que nacieron posteriormente a la intoxicación de sus madres. Estos bebés presentaban diferentes trastornos como parálisis cerebral, ceguera y discapacidades mentales. La Corporación Chisso fue identificada como responsable de la contaminación por sus vertidos entre 1932 y 1968.¹⁶ En la Figura A.3. se muestra la imagen que se convirtió en el icono del desastre de Minamata tras su publicación en la revista americana Life.



Figura A.3. Fotografía de W. Eugene Smith titulada "Tomoko Uemura in Her Bath".

En esa misma década, en Suecia, empezaron a observarse problemas neurológicos en las aves depredadoras en el ecosistema acuático. Primero se pensó que podía estar relacionado con algún caso de grano tratado con Hg, ya que eran aves migratorias. Sin embargo, estas aves no se alimentaban de grano y pronto se descubrió que el mercurio provenía de las especies acuáticas que consumían.¹⁷ Fue la primera vez que se habló de metilación del mercurio. En el

año 1971, se produjo en Irak otro importante suceso de intoxicación con mercurio. En este caso, el mercurio procedía del pan elaborado en las casas de granjeros que se dedicaban al cultivo de trigo. El grano había sido distribuido por el gobierno iraquí y procedía de una empresa estadounidense. Este grano había sido tratado con un fungicida que contenía metilmercurio y estaba indicado para la siembra. Sin embargo, los granjeros lo almacenaron y lo emplearon tanto en su alimentación como en la de sus animales. Las consecuencias para su salud fueron muy similares a las acontecidas años antes en Minamata.¹⁸ En el año 1993, en Iwaki (Japón) se produjo un accidente industrial donde tres trabajadores se intoxicaron con altas concentraciones de Hg(0) vapor y murieron en menos de un mes.⁴ Este es el último caso de intoxicación por mercurio con consecuencias letales del que hay constancia.

A.1.2. Las especies químicas de mercurio

El mercurio puede existir en distintas especies químicas y estados de oxidación. Respecto a los estados de oxidación, el mercurio presenta tres estados de oxidación estables: mercurio elemental (Hg^0), ion mercúrico (Hg^{2+}) e ion mercurioso (Hg_2^{2+}). Por otra parte, las especies químicas más comunes en el medio ambiente son el mercurio elemental, el mercurio inorgánico en sus diferentes formas y los compuestos orgánicos de mercurio. Las propiedades fisicoquímicas como solubilidad, puntos de ebullición o polaridad, varían entre dichas especies, y determinan por tanto su papel a nivel biogeoquímico y su toxicidad.¹⁹ De las diferentes formas químicas del mercurio, el Hg(0) es la que tiene mayor presencia en la atmósfera (90% en estado gaseoso).^{20,21} Además, presenta un tiempo de residencia de hasta un año, que unido a su volatilidad facilita que pueda ser transportado a largas distancias desde la fuente de emisión.^{22,23}

A.1.2.1 El mercurio elemental

El mercurio es un elemento del grupo 12 o IIB de la tabla periódica, lo que indica que es un elemento de transición con dos electrones en su capa de valencia (d). Su número atómico es 80 y tiene un peso atómico de 200.59 u. En su estado elemental a temperatura ambiente es un líquido plateado, el único metal en ese estado en condiciones atmosféricas normales. Presenta

un punto de fusión de $-38.87\text{ }^{\circ}\text{C}$ y una densidad de 13.546 g cm^{-3} . El mercurio tiene una elevada presión de vapor, con lo que se volatiliza fácilmente a temperatura ambiente. La tensión superficial de mercurio líquido es de 484 dinas cm^{-1} , seis veces mayor que la del agua en contacto con el aire. Esto hace que el mercurio tienda a cohesionarse para disminuir su superficie y forme rápidamente gotas, como se muestra en la Figura A.4, donde ha sido liberado tras la ruptura de un termómetro y se reorganiza formando gotas.

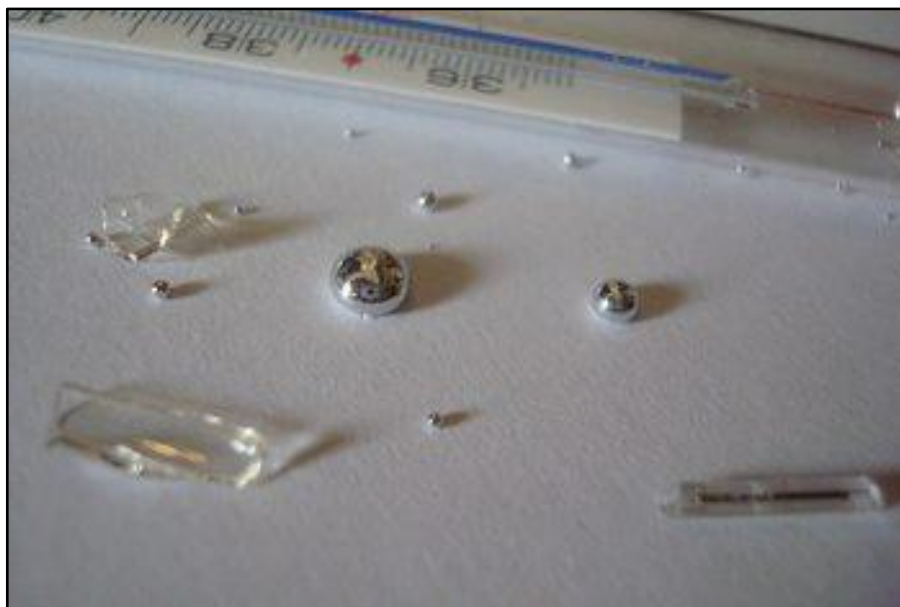


Figura A.4. Gotas de mercurio elemental producidas por la ruptura de un termómetro.

En aire seco el mercurio metálico no se oxida, pero después de una larga exposición al aire húmedo, el metal se cubre con una película delgada de óxido. El $\text{Hg}(0)$ se disuelve en ácidos con alto poder oxidante (ácido nítrico, ácido sulfúrico concentrado y agua regia). Además, es soluble en lípidos, siendo su solubilidad en agua muy baja: $0.303\text{ }\mu\text{M}$, lo que equivaldría a unos $20\text{-}60\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$. Tiene un coeficiente de dilatación térmica de $1.8 \cdot 10^{-5}\text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$, lo que indica que se dilata al 0.18% de su volumen con cada grado que se incrementa la temperatura. Esta característica, junto con su estado líquido facilitó su utilización en termómetros y otros aparatos de medida. El $\text{Hg}(0)$ puede estar en equilibrio entre las fases sólida, líquida y gaseosa. Su presión de vapor es elevada, y esto hace que su concentración atmosférica aumente con la temperatura. En la Tabla A.1 se muestran otras propiedades del mercurio obtenidas de Habashi.²⁴

Tabla A.1. Propiedades fisicoquímicas del mercurio elemental²⁴.

Símbolo químico	Hg
Número atómico	80
Peso atómico	200.59
Grupo	12
Periodo	6
Aspecto	plateado
Bloque	d
Densidad (0°C, g cm ⁻³)	13.546
Punto de fusión (°C)	-38.87
Punto de ebullición (°C)	356.9
Presión de vapor a 20°C (mm Hg)	0.002
Coefficiente de dilatación térmica (°C ⁻¹)	1.8 · 10 ⁻⁵
Configuración electrónica	[Xe] 4f ¹⁴ 5d ¹⁰ 6s ²
Estados de oxidación	2, 1
Estado	líquido
Solubilidad en agua (µM)	0.303
Constante de Henry	10 ⁻³ – 10 ⁻⁴
Potenciales de ionización (kcal mol ⁻¹)	
1 ^{er} potencial	241
2 ^o potencial	432
3 ^{er} potencial	789

El mercurio presenta siete isótopos estables (196, 198, 199, 200, 201, 202, 204) y cuatro isótopos radiactivos (194, 195, 197, 203). Las propiedades de estos isótopos, con sus correspondientes abundancias naturales teóricas, están recogidas en la Tabla A.2.

Tabla A.2. Propiedades de los isótopos estables de mercurio (entre paréntesis las incertidumbres asociadas a las últimas cifras decimales).^{25,26}

Isótopo Hg (masa nominal)	Masa atómica (m_a/u) ²⁵	Abundancia natural (% de átomos) ²⁶	Espín nuclear (I) ²⁵	Momento magnético (μ/μ_N) ²⁵
196	195,965833 (3)	0,15 (1)	0+	0
198	197,9667690 (4)	10,04 (3)	0+	0
199	198,9682799 (4)	16,94 (12)	$1/2 -$	+0,5058855 (9)
200	199,9683260 (4)	23,14 (9)	0+	0
201	200,9703023 (6)	13,17 (9)	$3/2 -$	-0,56022557 (14)
202	201,9706430 (6)	29,74 (13)	0+	0
204	203,9734939 (4)	6,82 (4)	0+	0

A.1.2.2 Mercurio (II) o mercurio inorgánico

El mercurio se encuentra en su forma inorgánica, denotada como Hg(II), a lo largo del planeta principalmente en depósitos geológicos de cinabrio (HgS). En este mineral que se caracteriza por su color rojo (Figura A.5) el mercurio puede alcanzar contenidos de hasta el 86%. Se trata de la principal forma de mercurio, cuyos depósitos mayoritarios alcanzan hasta el 2,5% del contenido total del elemento en la corteza terrestre. A pesar de estos grandes yacimientos, es un elemento poco abundante, con una concentración media de 0,08 partes por millón (ppm) en la corteza terrestre.²⁷ Otras rocas como el granito pueden contener 0,2 ppm de mercurio. Además, puede encontrarse, a nivel de trazas o ultratrazas en el agua, el suelo, el aire o los seres vivos.

El Hg(II) tiene una gran afinidad por el S, pero también forma complejos estables con ligandos tales como OH⁻, Cl⁻, Br⁻, I⁻, SO₂⁻, y CN⁻. Los compuestos más comunes, además del HgS, son las sales de HgCl₂ y el Hg(OH)₂. En los sistemas biológicos, el catión Hg(II) tiende a unirse a moléculas, como es el caso de los aminoácidos, a través de sus grupos sulfhidrilo (-SH). También se observa gran afinidad del Hg(II) por el Se, llegando a considerarse esta unión una forma de detoxificación en el organismo, ya que reduce la biodisponibilidad del mercurio.²⁸



Figura A.5. Cinabrio de Almadén perteneciente al Instituto Geológico y Minero de España (IGME)

Por efecto de las emisiones de mercurio a la atmósfera, también se encuentra Hg(II) disuelto en agua o adsorbido en partículas y gotas, y que constituye aproximadamente el 3% del mercurio gaseoso.²⁹ Las especies de Hg(II) presentan una mayor solubilidad en agua a presión atmosférica que el Hg(0).³⁰ Es una especie reactiva que se deposita rápidamente, influida por cambios estacionales y climáticos, y por tanto, tiene un tiempo de residencia atmosférico mucho más corto que el Hg(0).³¹

A.1.2.3 Mercurio orgánico

Los compuestos orgánicos de mercurio se caracterizan por la presencia de un enlace C-Hg covalente muy estable. Normalmente el mercurio presente en la naturaleza está unido a uno o dos átomos de carbono. Las formas principales en el medio ambiente son el monometilmercurio (MeHg) y en menor medida el dimetilmercurio (Me₂Hg). Otras especies comunes son el etilmercurio (EtHg) o el fenilmercurio (PhHg), las cuales han mostrado una alta capacidad antibacteriana por lo que se han utilizado para tales fines. Dentro de las especies monometiladas de mercurio, las más comunes son el cloruro (MeHgCl) o el hidróxido (MeHgOH), del mismo modo que sucedía con las especies de mercurio inorgánico. Estas formas químicas presentan una elevada solubilidad en lípidos y están consideradas altamente tóxicas. Dentro de las

especies orgánicas de mercurio, el MeHg es la que tiene un mayor interés a nivel medioambiental y toxicológico. Esto se debe a que se sintetiza de forma natural en los ecosistemas marinos, como se detallará en la Sección A.1.5.

A.1.3. Aplicaciones de las especies químicas de mercurio

La extracción minera de mercurio se incrementó durante los siglos XVI y XVII, debido a la demanda generada para el tratamiento de los minerales de oro y plata descubiertos en América. Actualmente el Hg sigue empleándose en la minería artesanal de oro, principalmente en algunos países subdesarrollados, ya que esta práctica ha sido restringida a nivel mundial a raíz del Convenio de Minamata. La extracción consiste en la formación de una amalgama entre el oro y el mercurio, que posteriormente se separa por calentamiento, liberando Hg(0) vapor al medio ambiente (Figura A.6).



Figura A.6. Mineros extrayendo el oro con Hg en río Caquetá (Colombia)

Las especies químicas de Hg también presentan varias aplicaciones industriales, que han contribuido al incremento de la concentración de este elemento a nivel atmosférico. El ejemplo más importante es la industria del cloro álcali dónde se produce cloro (Cl_2) a partir de sal común NaCl, obteniendo como subproductos sosa cáustica (NaOH) e hidrógeno (H_2). En las plantas tradicionales se empleaban celdas de Hg(0) líquido, donde éste actuaba como cátodo. A partir

de 1985, las plantas construidas en EEUU sustituyeron estas celdas por nuevas tecnologías menos contaminantes. Aunque el mercurio se reutiliza, su alta volatilidad hace que se vaya evaporando poco a poco.³² El HgCl_2 también se ha utilizado como catalizador en la producción del monómero de cloruro de vinilo, que se utiliza para fabricar policloruro de vinilo (PVC). En la industria del acetaldehído, se utilizó HgSO_4 como catalizador en la producción a partir de acetileno. El acetileno se hace pasar a través de un reactor que contiene Hg(II) en ácido sulfúrico, y éste se reduce a Hg(I) , que posteriormente es re-oxidado a Hg(II) .

El Hg(0) se ha utilizado en sistemas eléctricos como los interruptores o las lámparas fluorescentes, y en instrumentos de medida (termómetros, barómetros, tensiómetros, manómetros, etc.). Hasta la segunda mitad del siglo XX, el 50% de la producción mundial de mercurio se empleaba en la fabricación de tubos fluorescentes, lámparas de vapor, termómetros, barómetros o lámparas UV. El Hg(II) también se empleó en las pilas de zinc-óxido de mercurio. Estas pilas fueron desarrolladas a mitad del siglo XX y han sido desplazadas poco a poco por las de óxido de plata, debido a su toxicidad. El cloruro mercurioso (Hg_2Cl_2), conocido como calomelano, además de su aplicación a nivel de laboratorio en electrodos, ocasionalmente se empleó como medicamento. Otro compuesto de Hg(II) , el fulminato de mercurio [$\text{Hg(OCN}_2)_2$], ha sido utilizado en el ámbito militar debido a su alto poder detonante. El Hg(0) también se ha utilizado durante más de 150 años en el campo de la odontología formando parte de los clásicos empastes plateados, ilustrados en la Figura A.7.

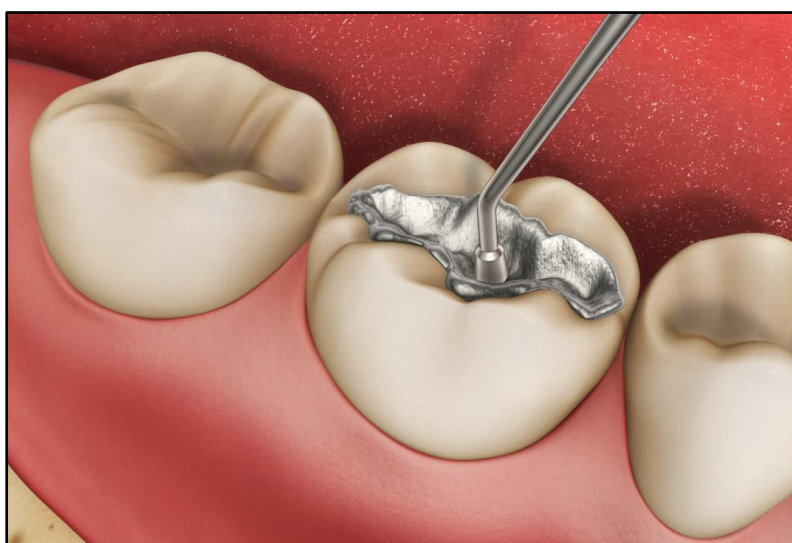


Figura A.7. Recreación de los empastes con amalgamas de Hg

La principal referencia al uso de amalgamas viene del francés O. Taveau, quien hizo pública en París (1826) la combinación de plata y mercurio para formar una amalgama (pasta, mezcla de plata). Este fue el nacimiento de la amalgama dental,³³ que se empezó a utilizar en EEUU en 1833, por los hermanos Crawcours como material de obturación sustituyendo al oro. Las amalgamas dentales están constituidas por un 50% de Hg(0) líquido además de Zn, Sn, Cu y Ag.¹⁷ La amalgama dental se caracterizaba por ser un material manejable, duradero, resistente, rápido de colocar, de bajo coste y además, con propiedades antibacterianas. En las últimas décadas su empleo ha disminuido debido a su efecto toxicológico, unido a la regulación que ha limitado su utilización.

En cuanto a los compuestos orgánicos de mercurio, éstos se sintetizaron principalmente debido a sus propiedades antibacterianas. Compuestos como el dimetilmercurio, acetato de fenilmercurio, fosfato de etilmercurio o dicianodiamida de metilmercurio, etc., se emplearon en formulaciones plaguicidas y biocidas, y también en cosméticos, como es el caso de las sales de fenilmercurio. Un incidente relacionado con la utilización de estos compuestos, fue el del grano contaminado en Irak.¹⁸ comentado en la sección **. Otro caso que ha causado una gran controversia social es el uso del Tiomersal en vacunas multidosis. El Tiomersal contiene un compuesto de mercurio (mercurotiosalicilato sódico), cuya fórmula se muestra en la Figura A.8, que se descompone en el organismo como EtHg.^{16,34} Sin embargo, las investigaciones sobre este compuesto no permiten determinar si la incorporación al organismo del EtHg procedente de esas vacunas ocasiona algún riesgo para la salud. También la popular Mercromina, empleada como antiséptico, estaba constituida por un 2% de merbromina, cuya fórmula química (Figura A.8) muestra que también contiene Hg en su estructura.

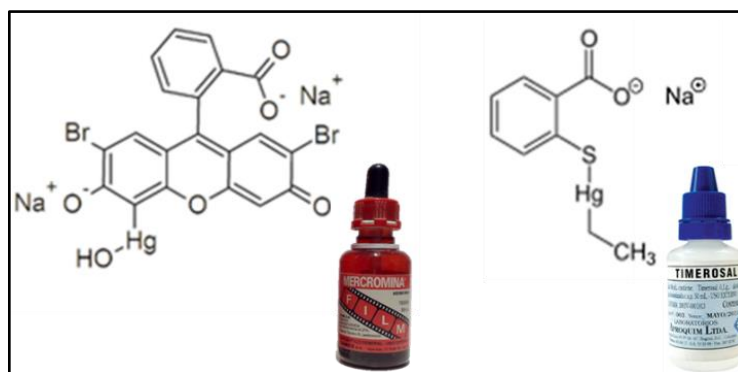


Figura A.8. Fórmula química del principio activo de la mercromina (izquierda) y del tiomersal (derecha).

A partir de los años 50, debido al mayor conocimiento de los efectos nocivos del mercurio y sus compuestos, comenzó a disminuir la demanda de Hg. Por ejemplo, en el caso de Francia el consumo pasó de 300 a 60 toneladas entre 1970 y 1990. Sin embargo, aún se emplea en muchos de los campos anteriormente mencionados. Desde la implantación del Convenio de Minamata, y el cierre de las principales minas de mercurio del mundo (Almadén e Idríja), el mayor productor minero de Hg es China.³⁵ En la Tabla A.3 se muestran los datos extraídos de un informe del PNUMA³⁶ sobre la demanda de Hg a nivel global en el año 2005.

Tabla A.3. Estimaciones de la demanda global de mercurio para productos y actividades en el año 2005 y expectativa de la demanda para el año 2015 (PNUMA, 2013).³⁵

Actividad/producto	Demanda global de Hg 2005 (toneladas)	Espectativa de la demanda global de Hg 2015 (toneladas)
Extracción de oro artesanal a pequeña escala	650 - 1000	Ningún cambio importante
Producción PVC	715 - 825	Aumento hasta 1250
Producción cloro-álcali	450 - 550	Disminución de 30%
Baterías	260 - 450	Disminución de 50%
Amalgamas dentales	300 - 400	Disminución de 10%
Aparatos de medición	300 - 350	Disminución de 45%
Aparatos eléctricos y electrónicos	120 - 150	Disminución de 10%
Iluminación	170 - 210	Disminución de 40%
Otros (pinturas, laboratorio, farmacéutico, usos tradicionales ...)	200 - 420	Disminución de 15%
Total	3,165 – 4,365	

De estos datos cabe destacar que la mayor reducción de la demanda del Hg se esperaba en las baterías, aparatos de medida y lámparas, debido a las restricciones legislativas. Sin embargo, en la extracción de oro artesanal con mercurio no se esperaba ningún cambio significativo, y sí se esperaba un aumento en la producción de PVC. Actualmente la regulación sobre mercurio ha hecho que la demanda se reduzca, estando prohibida la exportación/importación de mercurio en muchos países adscritos al Convenio de Minamata, como se detallará más adelante (Sección A.1.7).

A.1.4. Emisiones de las especies químicas de Hg

Las emisiones de mercurio pueden ser naturales o antropogénicas y se producen principalmente por la evasión de Hg(0) gaseoso, aunque también se emiten otras formas del elemento. A continuación, se explica detalladamente cada uno de esos tipos de fuentes de emisión:

A.1.4.1. Fuentes de emisión naturales

Como se ha descrito previamente, el mercurio es un elemento natural que se encuentra en la corteza terrestre. El mercurio es liberado a la atmósfera por procesos naturales como es el caso de las erupciones volcánicas, terrestres o a través de fisuras en el fondo marino. También emiten mercurio procesos geotermales o erosivos, de los minerales que lo contienen. Una vez que es liberado a la atmósfera, este mercurio se incorpora al denominado ciclo biogeoquímico. A medida que el mercurio entra en contacto con la biosfera, tanto la vegetación como el agua o los suelos se convierten en nuevos focos de emisión. Esto hace que las fuentes naturales emitan en torno a un 70% de la carga total de mercurio a la atmósfera,³⁷ siendo la mayoría procedente de la reemisión de ese mercurio previamente depositado. De ese modo, como muestra la Tabla A.4., extraída de Pirrone *et al.*,³⁸ la mayoría del mercurio de fuentes naturales (en torno al 52%) se debe a la reemisión desde los océanos.

Tabla A.4. Emisiones globales de fuentes naturales de Hg estimadas en el año 2008 (Pirrone *et al.*).³⁷

Fuente natural	Mercurio (Toneladas año ⁻¹)	Contribución (%)
Océanos	2682	52
Lagos	96	2
Bosques	342	7
Tundra/Sabana/Pastizales/Praderas/Chaparrales	448	9
Desierto/ zonas metalíferas/zonas sin vegetación	546	10
Zonas agrícolas	128	2
Evasión de mercurio tras eventos de depleción	200	4
Quema de biomasa	675	13
Volcanes y áreas geotermales	90	2
TOTAL	5207	100

La reemisión de mercurio está influida por la utilización del suelo. Por ejemplo, los incendios forestales producen emisiones de mercurio procedentes de la biomasa. Aunque las emisiones naturales se producen principalmente como Hg(0) vapor, también pueden liberarse óxidos particulados, sulfuros y haluros o metilmercurio gaseoso. En algunos estudios las fuentes que producen reemisión de Hg no se consideran fuentes naturales, ya que ese mercurio tiene mayoritariamente un origen antropogénico.

A.1.4.1. Fuentes de emisión antropogénicas

Las emisiones antropogénicas son las que derivan directamente de las actividades humanas. Aquellas que más contribuyen a las emisiones de mercurio, son la quema de combustibles fósiles y la minería de oro artesanal a pequeña escala. En la Figura A.9 puede observarse un diagrama de sectores con las distintas fuentes antropogénicas de acuerdo a su aportación a la carga total de emisiones antropogénicas de mercurio con datos extraídos de PNUMA (2013).³⁹

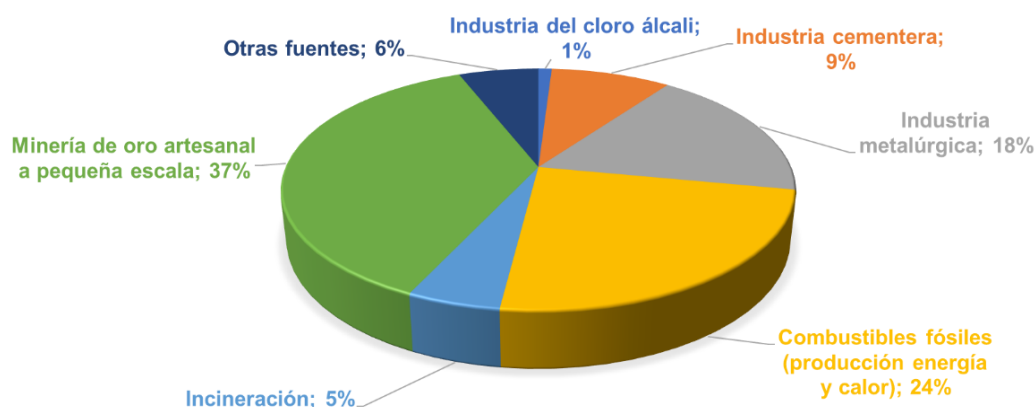


Figura A.9. Distribución de emisiones antropogénicas según la fuente de origen.³⁹

Las principales fuentes de emisión son la extracción de oro artesanal, la quema de combustibles fósiles y la industria metalúrgica por este orden.^{37,40} Los materiales fósiles como el carbón o el petróleo, contienen mercurio como impureza el cual se libera al aire durante el proceso de combustión. A partir de la era industrial, las actividades humanas aumentaron las

emisiones de mercurio debido a una mayor demanda energética. Tanto la actividad industrial como el transporte rodado son fuentes de emisión de mercurio, así como de otros contaminantes. Las emisiones han disminuido en los últimos años, por acciones políticas en favor del medioambiente, en países de Europa y los EEUU. Sin embargo, en los países asiáticos siguen siendo elevadas, siendo Asia o India quienes lideran la actual emisión antropogénica global de mercurio (Figura A.10. extraída de Pacyna *et al.*).³⁷

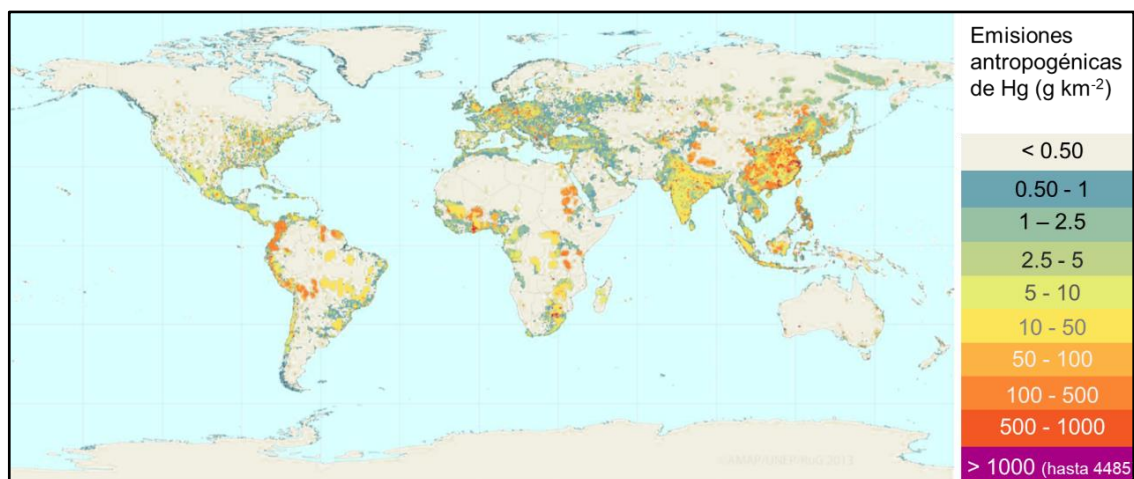


Figura A.10. Distribución espacial de emisiones antropogénicas de Hg en 2010 (Pacyna *et al.*).³⁷

Este aumento en las emisiones, principalmente de países asiáticos, se debe a la quema de combustibles fósiles, debido a la creciente demanda energética e industrial. Se estima que las emisiones de fuentes naturales y antropogénicas están en el rango de 4000–6300 toneladas al año.⁴¹ Este mercurio permanecerá en la atmósfera, el océano y la superficie terrestre en torno a unos 3000 años antes de volver a incorporarse a los sedimentos.

A.1.5. Ciclo biogeoquímico

Los compuestos de mercurio se encuentran distribuidos entre los diferentes compartimentos medioambientales, en función de sus características fisicoquímicas y de su origen a nivel atmosférico. Las especies de mercurio experimentan transformaciones, dando lugar al ciclo biogeoquímico natural del mercurio. En este ciclo intervienen los procesos de transformación, transporte, deposición y reemisión entre las especies de mercurio.⁴² Una

representación de dicho ciclo se muestra en la Figura A.11 adaptada de Engstrom,⁴³ donde se observan las principales transformaciones a nivel atmosférico, terrestre y acuático.

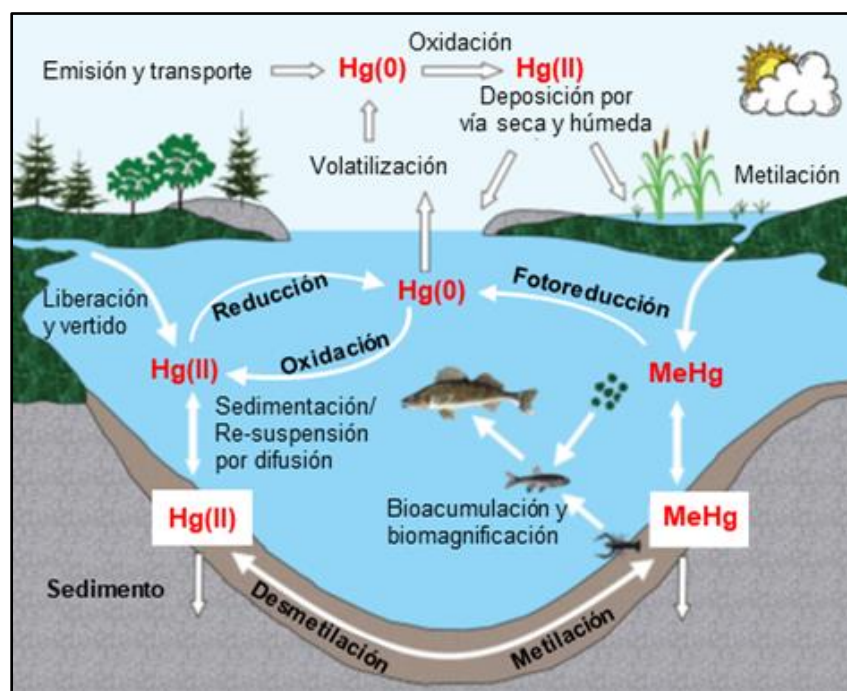


Figura A.11. Ciclo biogeoquímico del Hg adaptado de Engstrom.⁴³

Los seres humanos hemos alterado el ciclo biogeoquímico natural del mercurio, principalmente debido a la quema de combustibles fósiles, la actividad industrial y la minería. Este mercurio liberado antropogénicamente circulará a nivel atmosférico a lo largo de los siguientes siglos e incluso milenios. Las fuentes antropogénicas liberan principalmente Hg(0) a la atmósfera, pero también Hg(II) y Hg asociado a partículas. El Hg(0) es la especie que tiene un mayor tiempo de residencia en la atmósfera (entre 0.5-1 año), mientras que las formas oxidadas y particuladas son las que se depositan mayoritariamente.⁴² El Hg(0) gaseoso no se deposita ni por vía húmeda ni por vía seca, ya que tiene una alta presión de vapor y una baja solubilidad en agua. El Hg(II) pasa mucho más fácilmente a la fase acuosa, depositándose por acción de la lluvia. Varias especies han sido postuladas como oxidantes del Hg(0) a nivel atmosférico, entre ellas el O₃ y el Cl₂.^{21,29,44} Otra de las hipótesis es que el Hg(II) tendría su origen en la oxidación fotoquímica a través de un mecanismo radicalario.⁴⁵⁻⁴⁷ Cuando el Hg(II) se deposita, se incorpora al suelo, a la biota y también a las aguas dulces y oceánicas. En la superficie terrestre, el 90%

del mercurio se encuentra en el suelo asociado a materia orgánica a través de grupos funcionales con azufre.⁴⁸ Parte del Hg(II) depositado es reducido a Hg(0) y nuevamente volatilizado a la atmósfera, estableciéndose un flujo de Hg(0), en especial en aguas oceánicas. Este proceso es uno de los principales reguladores de la concentración de mercurio en las grandes masas de agua. La formación de Hg(0) en la superficie del océano y su posterior eliminación por volatilización es un componente de especial interés en el ciclo global de mercurio, puesto que la reemisión es una de las principales fuentes de Hg(0). Las vías de reducción química del mercurio propuestas en la fase acuosa incluyen la reducción mediada por sulfitos o la fotoreducción.⁴⁹⁻⁵²

La metilación de mercurio en las aguas naturales y sedimentos es uno de los procesos claves en el ciclo global del mercurio. Esta transformación da lugar a metilmercurio un compuesto altamente tóxico y que presenta un importante riesgo para la salud. La producción de MeHg, da lugar a un subciclo en los ecosistemas acuáticos que se ilustra en la Figura A.12.⁵³ En estos ecosistemas es donde coexisten el mayor número de especies de mercurio, Hg(0), Hg(II), MeHg y Me₂Hg.

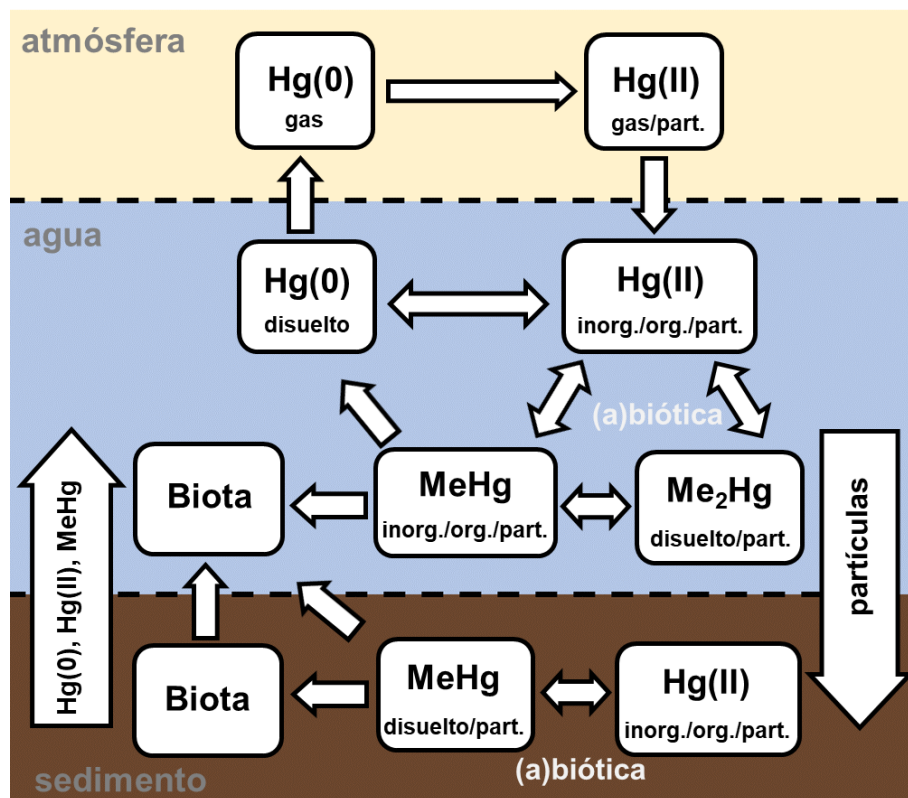


Figura A.12. Ciclo biogeoquímico del Hg en aguas oceánicas adaptado de Fitzgerald *et al.*⁵³

El MeHg es un producto intermedio en la formación de dimetilmercurio, el cual descompone a pH bajo. Por esta razón el dimetilmercurio sólo se encuentra en océanos a grandes profundidades, donde no hay luz y el pH es alto. Los mecanismos por los cuales tiene lugar la metilación aún no han sido completamente elucidados.⁵⁴ La producción de MeHg es un proceso microbiano que inicialmente se asoció con bacterias reductoras de sulfato (SRB) y hierro (FeRB).⁵⁵ En los ecosistemas acuáticos la concentración de MeHg es más elevada a gran profundidad, donde se concentra una mayor actividad de partículas y bacterias.⁵⁶ Sin embargo, esta hipótesis sobre la metilación bacteriana en sedimentos no explica los procesos oceánicos. En estos casos sólo la producción *in situ*, a lo largo de la columna de agua, logra explicar determinados niveles de concentración. Por tanto, los procesos de metilación pueden ocurrir por mecanismos bióticos y abióticos que se producen en la columna de agua y en los sedimentos.^{53,54,57,58}

El reciente descubrimiento de los genes de metilación^{59,60} ha confirmado la idea consensuada de que el origen bacteriano de MeHg es probablemente una de las principales vías de producción. Trabajos posteriores de determinación del MeHg, en varias bacterias y cepas arqueales, confirmaron que la posesión del gen HgcAB predice la capacidad de metilación del Hg(II).^{61,62} Con esto se demostró la capacidad metilante en una serie de especies distintas de las bacterias SRB y hierro FeRB, incluidos los metanógenos. La confirmación de la metilación por parte de organismos metanógenos tiene implicaciones potenciales para la salud humana, ya que estos organismos se encuentran en suelos inundados y anaeróbicos como es el caso de los arrozales. Por tanto, sería una explicación potencial para la contaminación por MeHg en el arroz.⁶³

Una vez que el MeHg está en la columna de agua, se puede degradar a través de procesos fotoquímicos o bacterianos.^{53,64} La desmetilación biológica no se ha detectado en las aguas aeróbicas de los lagos y tiende a ocurrir en áreas de metilación, como los sedimentos, que tienen un alto contenido orgánico y condiciones anóxicas.⁶⁵ En este caso también se habla de un componente genético de dichas bacterias, por la presencia del gen organomercurial liasa que permite a la bacteria romper el enlace mercurio-carbono.⁶⁶ Ambos procesos pueden

correlacionarse con la presencia de materia orgánica disuelta. Una hipótesis es que en la transformación fotoquímica, la materia orgánica puede disminuir el potencial de la fotoreducción debido a que competiría con las especies de MeHg por la captación de fotones.⁶⁷

La metilación del Hg(II) da lugar a dos nuevos conceptos en el ciclo biogeoquímico: la bioacumulación y la biomagnificación. Una vez que el Hg(II) se metila, se acumula rápidamente en la red alimentaria y se biomagnifica en la cadena trófica.⁶⁸ Estos procesos se producen por la transferencia del MeHg en la cadena trófica. La bioacumulación del MeHg tiene lugar en los tejidos de los peces.⁶⁹ Se ve favorecida por la escasa detoxificación del MeHg que presentan los peces, y su principal consecuencia es la de elevar la concentración del compuesto dentro del organismo, a pesar de que la concentración externa no sea elevada. Aunque la metilación también produce Me₂Hg, éste no se bioacumula y por tanto no supone un riesgo tan elevado para la salud humana ya que no se transfiere en la cadena trófica, a pesar de su alta toxicidad. Esta bioacumulación conduce a la segunda propiedad, que es la biomagnificación de las especies de mercurio en la cadena trófica. Esto hace que a medida que se asciende en los niveles tróficos la concentración de MeHg sea más elevada, como se describe en la Figura A.13. Recientemente se ha determinado que la presencia de materia orgánica parece tener influencia sobre la bioacumulación de MeHg en la cadena trófica.⁷⁰

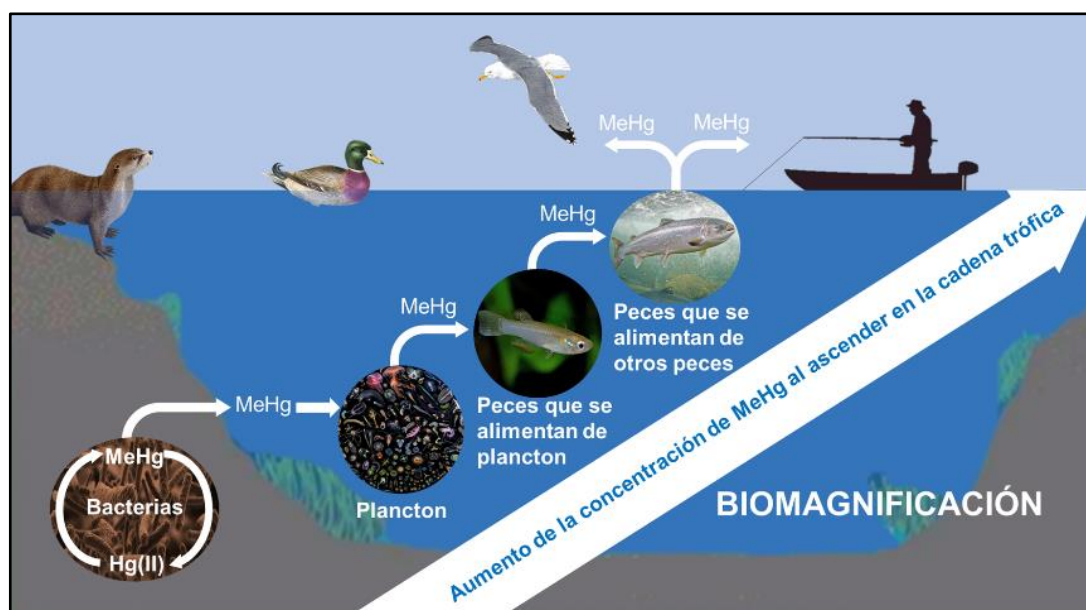


Figura A.13. Esquema descriptivo de la biomagnificación de MeHg producida en el medio acuático.

La cantidad neta de MeHg presente en las aguas es el resultado del balance entre los procesos de metilación, desmetilación, adsorción, desorción y difusión, que se producen en el medio acuático.^{53,71} La comunidad científica ha logrado avances significativos en los últimos años en la comprensión de los procesos que contribuyen al riesgo de MeHg en el medio ambiente, pero hasta el momento, es difícil determinar con precisión las rutas individuales que rigen el origen y la producción de MeHg en ecosistemas complejos.

A.1.6. Toxicocinética y toxicodinámica de las especies químicas de Hg

A.1.6.1. Exposición y absorción de las especies químicas de Hg

La incorporación de las especies de mercurio se produce por tres vías principales: respiratoria, digestiva o cutánea. Mediante la inhalación, podemos incorporar tanto Hg(0) como algunos compuestos volátiles de Hg(II). La mayor parte de intoxicaciones, se deben a exposiciones ocupacionales a altos niveles de Hg(0) gaseoso.⁴ Además, la inhalación de Hg(0) puede producirse desde las amalgamas dentales, simplemente por la propia masticación⁷². Estas amalgamas dentales están constituidas por un 50% de Hg(0) líquido además de plata y otros metales como Cu, Sn y Zn.⁷³ El Hg(0) vapor se absorbe a través de la membrana alveolar rápidamente, y en unas tres horas ya se observa su presencia en el plasma.⁷⁴ Su posterior transferencia a la sangre desde los pulmones podría alcanzar un 80%. El resto o bien se retiene en el aparato respiratorio o es exhalado. Se ha determinado que entre un 7-14% se elimina a través de la exhalación pulmonar durante los dos días siguientes a la exposición.^{17,73}

La población no expuesta ocupacionalmente incorpora mercurio en el organismo principalmente a través de la ingesta, es decir, por vía alimentaria. El mercurio se encuentra en la mayoría de los alimentos, como Hg(II), en concentraciones de unos pocos ng g⁻¹. Sin embargo, muchos pescados y mariscos contienen MeHg, en concentraciones elevadas (en el rango de los µg g⁻¹),⁷⁵ como consecuencia de su bioacumulación y biomagnificación en la cadena trófica. La absorción gastrointestinal de los compuestos orgánicos por vía alimentaria puede alcanzar hasta

un 95%, mientras que los inorgánicos se absorben entre un 2-15%.⁷³ En el caso de la ingestión de Hg(0) líquido, éste apenas es absorbido por el tracto gastrointestinal, por tanto, no se considera un mecanismo de absorción de interés toxicológico.

Por vía cutánea, se han descrito algunos casos de intoxicación por contacto de los compuestos de mercurio con la piel, aunque se trata del empleo de ungüentos y pomadas que lo contienen, así como incidentes laborales.⁷⁶ Por vía subcutánea también puede producirse la incorporación de EtHg en el organismo. Esto se debe a las vacunas que contienen Tiomersal, el cual se descompone en medio acuoso liberando EtHg a la sangre.^{77,78}

A.1.6.2. Distribución y biotransformaciones de las especies de mercurio en el organismo

Las diferencias en el metabolismo del mercurio en diferentes órganos se deben en gran medida a las capacidades de unión de las formas químicas del mercurio y a la estabilidad de los enlaces carbono-mercurio establecidos. Una vez en la sangre, el mercurio se divide entre el plasma y los glóbulos rojos. En los eritrocitos hay 20 veces más concentración de Hg que en el plasma. En el caso del MeHg su transferencia a los glóbulos rojos es de hasta un 90%.⁷³ Las especies de Hg se unen en los eritrocitos a la hemoglobina a través de residuos de cisteína con un grupo -SH libre.⁷⁹ Esta proteína es la más abundante en la sangre, y genera una amplia distribución del Hg en el torrente sanguíneo. Las especies químicas de Hg se distribuyen entre fluidos, órganos y tejidos dando lugar a un estado de equilibrio dinámico entre ellas.

Tanto MeHg como EtHg tienen la propiedad de atravesar fácilmente las membranas biológicas sangre-cerebro o sangre-placenta. En cambio, el Hg(II) no es permeable en dichas barreras. Una de las hipótesis que explicaría este fenómeno, se basa en sus características morfológicas cuando se unen a los residuos -SH. La unión entre MeHg y EtHg con L-Cisteína, da lugar a un complejo estructuralmente análogo a L-Metionina.^{72,80,81} Las moléculas transportadoras de aminoácidos LAT (*L-type neutral amino acid carrier transport*) se encargan de transportar la L-Met a través del organismo y pueden atravesar las membranas biológicas.

Por tanto, ese complejo análogo MeHg-L-Cys también puede ser transportado por los LAT. Esta propiedad explicaría por qué tanto MeHg como EtHg pueden atravesar la barrera placentaria para acceder al feto. El Tiomersal una vez en la sangre se descompone liberando EtHg. Este compuesto presenta un tiempo de vida medio en sangre menor que el MeHg, ya que se transforma rápidamente en Hg(II).⁸² Debido a esto se considera que el EtHg presenta una menor neurotoxicidad que el MeHg,³⁴ a pesar de que estudios *in vitro* muestren similitudes en su comportamiento.^{78,81}

El Hg(0) difunde fácilmente gracias a su liposolubilidad y se enlaza a los grupos tiol de las proteínas, reduciendo su funcionalidad. Esta liposolubilidad le facilita la difusión a través del organismo, y la capacidad de atravesar membranas biológicas. El vapor de Hg(0) se oxida a Hg(II) en los eritrocitos de la sangre, en una reacción catalizada por la catalasa.^{72,83,84} Esta transformación disminuye su liposolubilidad y por tanto su capacidad de difusión, con lo que también reduce su toxicidad. A partir de ahí, debido a la afinidad del Hg(II) se asocia a otras moléculas como es el caso de los aminoácidos que constituyen las proteínas. El Hg(II) tiene gran afinidad por diferentes ligandos (Se, S, P, I, Br, Cl, etc.). Pero los ligandos que presentan una mayor afinidad son los grupos tiol y selenol (-SH y SeH), lo que se demuestra por las constantes de formación con sus respectivos complejos.^{28,85-87}

El Hg(II) presenta diferencias en su acumulación en función del órgano o tejido. La mayor parte del Hg(II) se localiza en los riñones, generalmente unido a metalotioneínas renales. El segundo mayor depósito de Hg(II) en el organismo es el hígado, pero también se ha encontrado acumulación en el tracto intestinal, partes del cerebro, bazo, etc.⁸⁵ El Hg(II) presente en el cerebro procede de la oxidación del Hg(0) o de la desmetilación del MeHg. El Hg(II) forma complejos con el selenio, insolubles y que pueden permanecer años en el cerebro.⁷² Las selenoproteínas, presentes en el organismo, tienen una doble acción detoxificante respecto al Hg(II). En primer lugar el Hg(II) al unirse a través de los grupos SeH-, reduce su toxicidad.^{88,89} El Hg(II) dentro de su efecto toxicológico, libera especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden causar estrés oxidativo a nivel celular. Las selenoproteínas tiene propiedades antioxidantes, que permiten inhibir la liberación de dichos radicales.⁹⁰

La orina es la principal fuente de excreción del Hg(II). Por otro lado, los compuestos orgánicos se excretan principalmente por las heces,¹⁶ pero también se produce su acumulación tanto en el pelo como en las uñas, lo que sería otra forma de excreción. El MeHg eliminado a través de la orina es únicamente un 10% de la carga total de Hg excretada por esta vía. Además, en el caso del MeHg, se ha observado que la desmetilación juega un papel muy importante dentro del organismo como proceso detoxificante.⁹¹ Según Clarkson (2002)¹⁷ el MeHg es metabolizado lentamente en el tracto gastrointestinal, y transformado a Hg(II) por la microflora, lo que supone aproximadamente el 1% de la carga total de mercurio en el cuerpo al día. Además de producirse en el tracto intestinal, la desmetilación tiene lugar en varios tejidos, pero parece que la mayor parte se realiza en el hígado. En el cerebro, se produce también la desmetilación de MeHg, el cual posteriormente se combina con Se formando complejos inertes a modo de detoxificación.⁹²

La metilación *in vivo* se ha asociado tradicionalmente con la actividad de determinadas bacterias. Algunos estudios *in vitro* han mostrado capacidad metilante, tanto en la cavidad bucal como en el tracto intestinal de mamíferos.⁹³⁻⁹⁶ Sin embargo, en ningún caso se ha demostrado que la producción endógena de MeHg dé lugar a concentraciones relevantes para el organismo.⁹⁷ A raíz del descubrimiento de los genes metilantes, un estudio llevado a cabo en unos 1500 microbiomas humanos y de otros mamíferos, demostraron que sólo un metanógeno (*Methanomassiliicoccus luminyensis*), localizado en las heces humanas contenía el gen metilante.⁹⁸ Además, se ha demostrado que la probabilidad de encontrar dicho metanógeno metilante en la población humana, es menor del 0.001%.⁹⁹

A.1.6.3. Efecto toxicológico

Como ya se ha comentado, en estado iónico, el Hg(II) se fija a los grupos celulares ricos en radicales -SH y -SeH, alterando varios sistemas metabólicos y enzimáticos de la célula. El principal efecto que provoca afecta al desarrollo del Sistema Nervioso Central. El Hg(II) se une a los grupos -SH de los monómeros que constituyen los microtúbulos para la división y migración celular. En el cerebro adulto la destrucción neuronal que provoca el Hg, puede considerarse focalizada. Sin embargo, cuando lo hace en organismos en desarrollo como pueden ser fetos o

recién nacidos, la intoxicación puede dañar todas las áreas cerebrales causando un daño de mayores proporciones.¹⁰⁰⁻¹⁰³

El Hg también provoca riesgo cardiovascular. La exposición aguda promueve la reducción de la fuerza miocárdica e inhibe la actividad de la miosina ATPasa. La exposición crónica aumenta la resistencia vascular e induce la hipertensión.¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ El mercurio tiene una elevada afinidad por los grupos -SH de glutatión, N-acetilcisteína, ácido alfa lipoico y el selenio entre otros compuestos antioxidantes, y la disminución de la disponibilidad de estos antioxidantes incrementa el estrés oxidativo.¹⁶ El estrés oxidativo, asociado a una acumulación de especies reactivas tóxicas (ROS) procedente de la alteración del equilibrio entre los componentes celulares, es un factor fundamental de la neurotoxicidad. El estrés oxidativo provoca daños como esclerosis amiotrófica lateral, Parkinson, Alzheimer, etc.

En los glóbulos rojos hay mecanismos protectores mediados por proteínas que reducen la toxicidad del metal, como el glutatión (GSH). El GSH es un tripéptido con un grupo -SH libre en su forma reducida. El GSH tiene más afinidad por Hg(II) que por MeHg y esto hace que facilite su extrusión celular.¹⁰⁷ Halbach *et al.* (2008)¹⁰⁸ explicaron este procedimiento como un intercambio intracelular de especies de Hg mediadas por GSH con alta afinidad por Hg(II). Además, la presencia de Hg(II) induce la biosíntesis de metalotioneína renal.^{108,109} Las metalotioneínas son proteínas ricas en cisteína que tienen una función defensiva frente a la presencia de metales pesados. Por tanto, las metalotioneínas y el GSH actúan como factores preventivos contra la toxicidad renal aguda por mercurio inorgánico.¹¹⁰ Otra proteína afectada por la presencia de Hg(II) es la anhidrasa carbónica (CA), que es la segunda proteína más abundante de los eritrocitos después de la hemoglobina. La CA cataliza la hidratación reversible del dióxido de carbono. El CA humano de los eritrocitos contiene un residuo de cisteína con un grupo -SH libre que puede unirse al Hg(II).¹¹¹ Esta unión podría causar la inhibición de su actividad enzimática.¹¹²

A.1.6.4. Sintomatología y tratamiento tras exposición aguda

La intoxicación aguda con Hg(0) o Hg(II) se asocia a cuadros clínicos de hidrargirismo o mercurialismo, con afectación del sistema nervioso central. Algunos de los síntomas que presenta son sabor metálico, sangrado de encías, temblores, irritabilidad, labilidad emocional, debilidad muscular, hiperexcitabilidad, polineuropatía, amnesia, insuficiencia renal aguda, problemas dentales, problemas de visión (incluso ceguera), patologías del sistema cardiovascular (hipertensión arterial, taquicardia), problemas en la piel (dermatitis de contacto, acrodinia), patologías del sistema respiratorio (neumonitis, fibrosis, edema pulmonar).¹¹³ También se han dado casos de acrodinia por exposición a sales de mercurio inorgánico (mercurioso o mercúrico) o al fenilmercurio caracterizada por descamación, color rosado de las mejillas y plantas de los pies y manos. Los efectos teratógenos se han demostrado principalmente en los compuestos orgánicos que son los que atraviesan la membrana placentaria.¹¹⁴

Existen algunos compuestos, principalmente quelantes, indicados para la intoxicación por mercurio, aunque los tratamientos aún no están bien definidos en este campo. Los agentes quelantes se utilizan farmacológicamente en el tratamiento de la toxicidad por metales pesados. Los quelantes son moléculas que se unen fuertemente en una estructura de anillo a los metales. Un buen quelante clínico tendrá una baja toxicidad, se unirá preferentemente al metal pesado con una alta constante de estabilidad y tendrá una tasa de excreción mayor que las especies endógenas que se unen al metal. De este modo se pretende favorecer la eliminación del tóxico.

Desde la segunda guerra mundial se empleó el 2,3 dimercaptopropanol, conocido comúnmente como BAL (British Anti Lewisite). El BAL se empleaba como quelante metálico universal, principalmente indicado para el efecto del lewisita, un potente agente irritante con arsénico que se empleaba como arma química.¹¹⁵ Otros agentes quelantes, indicados para intoxicaciones por Hg(0) son: el 2,3 dimercaptopropano-1-sulfonato (DMPS); el ácido 2,3 dimercaptosuccínico (DMSA); y la D-penicilamina.^{116,117} En el caso de intoxicaciones por MeHg se puede emplear también N-acetil-DL-penicilamina junto con hemodiálisis. El tiosulfato de sodio

con aplicación cutánea también ha sido empleado en casos de quemaduras por fulminato de mercurio.

A pesar de que la intoxicación por Hg provoca graves trastornos para la salud, incluso la muerte, aún no se dispone de parámetros bioquímicos que sirvan como indicadores de los efectos. Tampoco hay un tratamiento que permita el control biológico, cuando las alteraciones orgánicas son todavía reversibles.

A.1.7. Legislación sobre compuestos de mercurio

El mercurio se ha regulado a nivel internacional desde los años 70, debido al aumento de la concentración atmosférica de las diferentes especies. El incremento de dicha concentración supone un riesgo para la salud humana y el medioambiente, lo que ha llevado a los gobiernos y organizaciones internacionales a tomar medidas para el control de las emisiones. La Organización de Naciones Unidas (ONU) ha coordinado a través de sus agencias para medio ambiente (PNUMA), salud (OMS) y agroalimentaria (FAO), los esfuerzos dedicados a concienciar a los estados miembros y al desarrollo de políticas medioambientales respecto al mercurio. En los Estados Unidos la regulación sobre los compuestos de mercurio está liderada por las agencias federales de Protección Medioambiental (EPA) y la Agencia de Alimentación y Drogas (FDA). La EPA comenzó en los 90 con la regulación de las emisiones de mercurio, dirigida principalmente al control en las plantas eléctrotérmicas.¹¹⁸ Del mismo modo, la comunidad científica se ha ido reuniendo en las últimas décadas para compartir sus investigaciones acerca de los riesgos del mercurio en el medioambiente y la salud.¹¹⁹ En el año 2002 el PNUMA presentó un informe para hacer frente común a los riesgos asociados al Hg.¹²⁰ A raíz de una serie de reuniones de expertos de la FAO y la OMS,^{75,121,122} se hizo necesaria la creación de un instrumento internacional de acción contra la contaminación por mercurio. En el año 2005 se lleva a cabo una reunión,¹²³ liderada por el PNUMA con el objetivo de concienciar a los países miembros de la ONU, sobre la problemática del mercurio como contaminante global. Por ello, la estrategia desarrollada debía abarcar los siguientes objetivos:

- Reducción de las emisiones de mercurio
- Restricción de la oferta y demanda de mercurio
- Resolución de los residuos y depósitos de mercurio
- Protección de la exposición a mercurio
- Concienciación
- Apoyo de iniciativas internacionales

En la 13ª Conferencia sobre Mercurio como Contaminante Global (ICMGP, por sus siglas en inglés) en 2017, se concluyó que los efectos del cambio climático en el planeta estaban afectando al ciclo biogeoquímico del mercurio y que debía adoptarse una serie de medidas para proteger la salud humana y el medioambiente. En esta reunión se apoyó la implementación del conocido Convenio de Minamata, suscrito en Ginebra en 2013.¹²⁴ Este Convenio es un tratado mundial, que tiene por objetivo la implantación de planes nacionales de medidas para controlar las emisiones, la minería artesanal y en general el riesgo sobre la salud asociados al mercurio.¹²⁵ El convenio cuenta con 128 firmas y 102 ratificaciones entre ellos, la de la Unión Europea.

En diciembre de 2002, la Comisión Europea presentó al Consejo Europeo un informe sobre el mercurio procedente de la industria del cloro. A raíz de ese informe, el Consejo instó a la Comisión a presentar una estrategia con medidas para proteger la salud humana y el medio ambiente de la liberación del mercurio.¹²³ En el año 2003, acorde con esta nueva perspectiva sobre el mercurio, se produce el cierre de las Minas de Almadén en España, la mayor explotación minera de mercurio del mundo. En los siguientes años se establecen una serie de reglamentos y directivas para la regulación de todos aquellos productos o actividades relacionadas con el mercurio a nivel de la UE. Algunos de estos reglamentos están resumidos en la Tabla A.5. La Unión Europea prohibió la exportación de mercurio en 2011, y Estados Unidos lo hizo en 2013.

Tabla A.5. Algunas de las normativas y reglamentos de la UE en los últimos 20 años en materia de legislación sobre uso de compuestos de Hg.

Objeto de la legislación	Directiva o Reglamento de la UE
Lámparas fluorescentes y RAEEs	Directiva 2002/95/CE ¹²⁶
Alimentos para animales	Directiva 2002/32/CE ¹²⁷
Pilas y acumuladores	Directiva 2006/66/CE ¹²⁸ Directiva 2008/12/CE ¹²⁹
Cosméticos	Reglamento (CE) 1223/2009 ¹³⁰
Límites máximos de mercurio en pescados	Reglamento (CE) 1881/2006 ¹³¹
Exportación y almacenamiento de Hg	Reglamento (CE) 1102/2008 ¹³²
Termómetros y otros aparatos de medida	Reglamento (CE) 1907/2006 ¹³³ Reglamento (UE) 847/2012 ¹³⁴
Uso de compuestos de fenilmercurio	Reglamento (UE) 848/2012 ¹³⁵
Prohibición de: <ul style="list-style-type: none"> • Exportación, importación y fabricación de Hg₂Cl₂, HgO, HgS, HgSO₄, Hg(NO₃)₂. • Minería artesanal • Lámparas fluorescentes con mercurio • Comercialización y fabricación de aparatos de medida con Hg • Uso de plaguicidas y biocidas con Hg 	Reglamento (UE) 2017/852 ¹³⁶
Restricción en el empleo de las amalgamas dentales con Hg	

A raíz de la firma del Convenio de Minamata, se ha limitado aún más las exportaciones, importaciones, almacenamiento, uso y fabricación de muchos elementos y compuestos con mercurio.¹³⁶ Con esta nueva normativa se hace hincapié en la preservación del medio ambiente, y la necesidad de ir eliminando el mercurio de forma progresiva con la excepción de aquellos usos dedicados a la investigación y el desarrollo científico y tecnológico.

Como se ha comentado previamente, el MeHg tiene un gran interés por su carácter toxicológico porque la principal fuente de exposición es el consumo de pescado. Esto ha llevado

al estudio y control de los niveles de Hg en los productos del mar y sus derivados. La EPA estableció un valor estándar para la dosis de MeHg diaria de $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal.¹³⁷ La FDA también adoptó la concentración de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ para MeHg en pescado, como el límite a partir del cual los productos no serían aptos para el consumo.¹³⁸ La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), basándose en las recomendaciones dadas por el Comité de Expertos FAO/OMS (JECFA, por sus siglas en inglés)¹²², estableció un límite provisional de tolerancia a la ingesta semanal (PTWI, por sus siglas en inglés) de MeHg. Este nuevo valor de PTWI de $1.6 \mu\text{g}$ de MeHg por kg de peso corporal, sustituyó a un valor previo de $3.3 \mu\text{g kg}^{-1}$.¹³⁹ En 2008 la Comunidad Europea publica el Reglamento(CE) 629/2008¹⁴⁰ que modificaba el Reglamento(CE) 1881/2006,¹³¹ por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. En el caso del pescado el contenido máximo de mercurio permitido se estableció en $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$. Las organizaciones OMS y PNUMA establecieron un valor seguro de ingesta semanal de MeHg de entre $0,7$ y $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal.¹⁴¹ En el año 2012, la EFSA señaló que, para el MeHg, nuevos estudios indicaban que los efectos beneficiosos de los ácidos grasos Omega 3 de cadena larga presentes en el pescado podían haber conducido a una infraestimación de los efectos adversos potenciales del metilmercurio del pescado y rebajó la ingesta semanal tolerable provisional a $1,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal.⁷⁵ En ese mismo informe, también se publicaron datos estadísticos de concentración de especies de Hg en diferentes productos alimentarios.

La OMS y la PNUMA establecieron una serie de pautas para la identificación de individuos en riesgo de exposición, debido principalmente a la exposición ocupacional.¹⁴² Estos valores son fijados por comités de expertos, y algunos de ellos se muestran en la Tabla A.6. Los niveles HBM son los límites establecidos por la comisión alemana de BioMonitorización Humana (HBM). El nivel HBM-I se establece en $5 \mu\text{g}$ de HgT por litro de sangre y $7 \mu\text{g L}^{-1}$ en orina, lo que indica que por debajo de este valor no existe riesgo para la salud. El HBM-II se corresponde con $15 \mu\text{g}$ de HgT por litro de sangre y $25 \mu\text{g L}^{-1}$ en orina, lo que indica el límite de la carga corporal de Hg con un mayor riesgo de efectos adversos para la salud.

Tabla A.6. Indicadores biológicos de exposición a HgT establecidos por diferentes comités y recogidos por la OMS y la PNUMA.¹²¹

Indicador biológico de exposición	HgT en sangre $\mu\text{g L}^{-1}$	HgT en orina $\mu\text{g L}^{-1}$	HgT en orina $\mu\text{g g}^{-1}$ en creatinina	HgT en pelo $\mu\text{g g}^{-1}$
HBM I	5	7	5	-
HBM II	15	25	20	5
BAT Hg(0) y Hg(II)	25	100	-	-
BAT mercurio orgánico	100	-	-	-
BEI	15	-	35	-

El límite HBM-II también se ha fijado en un nivel máximo de HgT en pelo de $5 \mu\text{g g}^{-1}$. El valor BAT (*Biologischer Arbeitsstoff-Toleranzwert*) es la concentración máxima permitida de una sustancia o sus metabolitos en los fluidos corporales, y para HgT es de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ en sangre y $100 \mu\text{g L}^{-1}$ en orina. En el caso del límite BAT para compuestos orgánicos, éste asciende hasta $100 \mu\text{g L}^{-1}$. El instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo (INSHBT) se encarga de definir los índices biológicos de exposición (BEI) en España. Estos límites deben garantizar que la salud de las personas sanas no se vea afectada al estar expuesto 8 horas al día o 40 horas a la semana. Según el BEI, el HgT en sangre al final de la semana laboral debe ser inferior a $15 \mu\text{g L}^{-1}$ y en orina inferior a $35 \mu\text{g g}^{-1}$ de creatinina. Estos valores han mostrado ser eficaces como indicadores biológicos, para evitar repercusiones negativas en la salud del trabajador expuesto.

A.2. Medida de relaciones isotópicas mediante espectrometría de masas

A.2.1. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas consiste en la determinación de la composición isotópica de un elemento o de una molécula, a través de la medida de las relaciones masa-carga (m/z) de los iones generados. Una buena definición de la técnica y su fundamento, es la dada por el Premio Nobel John Fenn.¹⁴³

“La espectrometría de masas es el arte de medir átomos y moléculas para determinar su peso molecular. Dicha información de masa o peso es a veces suficiente, frecuentemente necesaria y siempre útil para determinar la identidad de una especie. Para practicar esta técnica, se aporta carga a las moléculas de interés, es decir, los analitos, para medir a continuación, cómo las trayectorias de los iones resultantes responden en vacío a varias combinaciones de campos eléctricos y magnéticos. Claramente, el sine qua non de tal método es la conversión de las moléculas neutras en iones. Para las especies pequeñas y sencillas, la ionización es fácilmente conducida por la fase gaseosa entre las moléculas neutras y los electrones, fotones u otros iones. En los últimos años, los esfuerzos de muchos investigadores han llevado al desarrollo de nuevas técnicas para producir iones a partir de especies más grandes y complejas para ser vaporizadas sin una descomposición sustancial o incluso catastrófica.”

John B. Fenn, Premio Nobel de Química 2002

La espectrometría de masas nació en 1907 con la hipótesis de J.J. Thomson con el primer espectrómetro de masas. En la Figura A.14 se muestra un cronograma adaptado de Jakubowski *et al.* (2011),¹⁴⁴ con los acontecimientos históricos más destacados en el campo de la espectrometría de masas. Este cronograma abarca desde los primeros experimentos de Goldstein y Wien, hasta la aparición de los primeros instrumentos comerciales. Los trabajos más antiguos datan del año 1886, con Eugen Goldstein estudiando las propiedades de las descargas eléctricas producidas al aplicar un voltaje entre dos electrodos, los cuales estaban contenidos en un tubo con un gas a baja presión. Goldstein pudo observar que, además de los rayos catódicos (electrones), existía otro tipo de rayos que viajaban en sentido opuesto. En 1898, W. Wien descubrió que estos rayos tenían carga positiva y que, al igual que los rayos catódicos, eran desviados por campos eléctricos y magnéticos. En 1905 Thomson realizó varios experimentos en el tubo de rayos catódicos, comprobando que se podía mejorar la trayectoria de los rayos

descrita por Wien, disminuyendo la presión en el tubo. A través de la variación del campo magnético, pudo medir la corriente del haz iónico a través de una rendija, y esta corriente estaba relacionada con la masa. Estos descubrimientos sentaron los principios de funcionamiento de los espectrómetros que se comercializan hoy en día para diferentes aplicaciones.



Figura A.14. Cronograma de los hechos más destacados en la historia de la Espectrometría de Masas adaptado de Jakubowski *et al.*¹⁴⁴

Un espectrómetro de masas permite determinar la composición de una molécula o átomo a través de la medida de la relación m/z de los iones en que se descompone. Los iones se generan por la pérdida o ganancia de carga en las especies neutras, que posteriormente, son dirigidas en un analizador de masas hacia un detector. Los espectrómetros de masas constan de un sistema de introducción de muestra, una fuente de ionización, el sistema de extracción, el analizador y el sistema de detección y transducción de señales. En la Figura A.15 se muestran los componentes básicos de cualquier espectrómetro de masas.

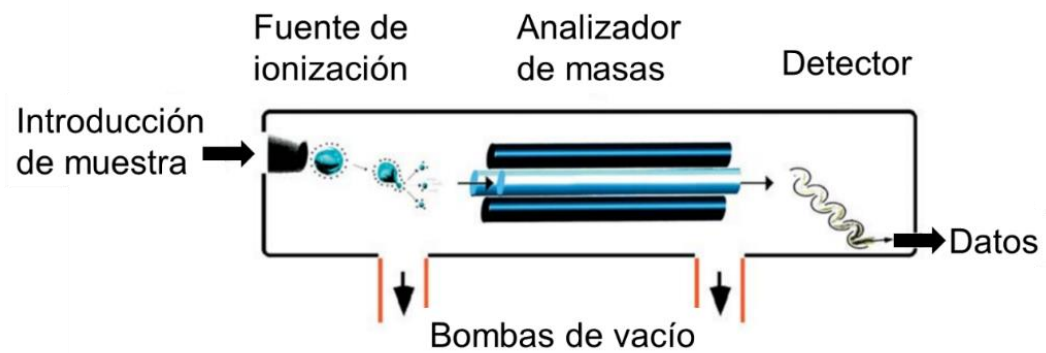


Figura A.15. Componentes básicos de un espectrómetro de masas adaptado de Siuzdak.¹⁴³

En las últimas décadas, la espectrometría de masas ha experimentado importantes avances tecnológicos. Esto ha hecho posible que a día de hoy sea una técnica de referencia en múltiples campos de aplicación como la proteómica, la metabolómica, el análisis medioambiental y en los análisis de drogas, clínicos o de DNA. En la presente Tesis Doctoral se han empleado tres sistemas híbridos de cromatografía de gases acoplados a espectrómetros de masas: (A) un equipo ICP-MS con analizador de tipo cuadrupolo (Agilent 7500ce); (B) un equipo ICP-MS con analizador de doble enfoque tipo multicolector (Neptune); y (C) un equipo GC-IRMS. En esta sección se explicará en detalle cada uno de ellos.

A.2.2. Fuentes de ionización

A.2.2.1. Fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP)

➤ Funcionamiento de la fuente de ICP

El plasma está considerado el cuarto estado de la materia. Se trata de un gas altamente ionizado que conduce la electricidad, generado a presión atmosférica. Este gas es neutro, con el mismo número de partículas positivas (iones) y negativas (electrones). En la Figura A.16 se muestra la imagen de una fuente ICP en la que se puede observar el plasma incidiendo directamente sobre el cono de muestreo.

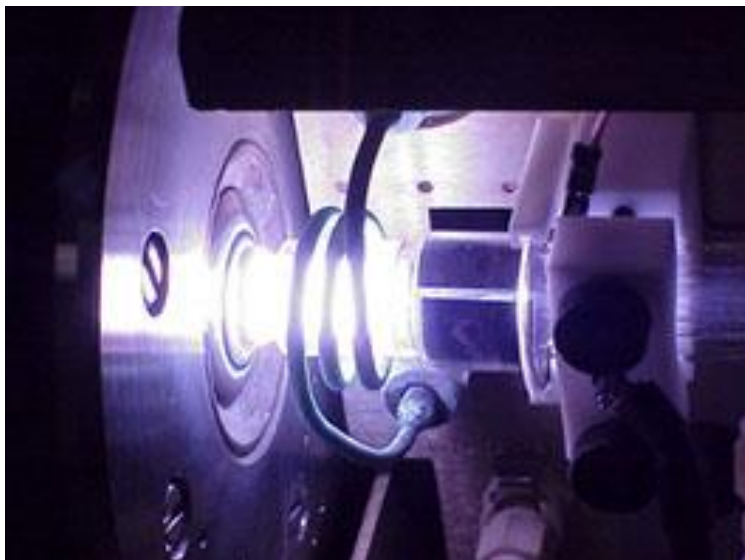


Figura A.16. Imagen de un plasma en la fuente de ICP-MS (Web: www.elementalanalysis.com).

El ICP es una fuente de ionización “dura”, que rompe las moléculas liberando e ionizando sus elementos constituyentes. Los componentes fundamentales que intervienen en la generación del plasma son el generador de radiofrecuencias (RF), la bobina de inducción y la antorcha. Esta última es una pieza de cuarzo con tres tubos concéntricos por los que pasan diferentes flujos de argón, como se ilustra en la Figura A.17. Por el tubo exterior pasa una corriente de argón de 12-15 L min⁻¹ (gas plasmógeno), cuyo objetivo es la formación del plasma al final de la antorcha y la refrigeración de la misma. El gas auxiliar, con un flujo de aproximadamente 1 L min⁻¹, pasa a través del tubo intermedio para ayudar a centrar el plasma en torno a los conos de muestreo. Finalmente, el aerosol de la muestra es arrastrado a través del canal central por una tercera corriente de argón de aproximadamente 1 L min⁻¹ (gas portador). En la cabeza de la antorcha se encuentra la bobina de inducción, generalmente de cobre y conectada al generador de RF. Para la generación del plasma se hace pasar un flujo alto de argón mientras se le aplica a la bobina de inducción una potencia de RF de 0.75-1.5 kW. De esta manera se genera una corriente alterna que oscila con una velocidad proporcional a la frecuencia aplicada (27 o 40 MHz, generalmente) y origina un campo electromagnético. Llegado a este punto, una chispa de alto voltaje libera una corriente de electrones que enciende el plasma al chocar con los átomos de Ar e ionizarlos. Esta reacción en cadena da lugar al plasma, que se mantiene en estado estacionario por el aporte continuo de Ar y de energía de RF del generador.¹⁴⁵

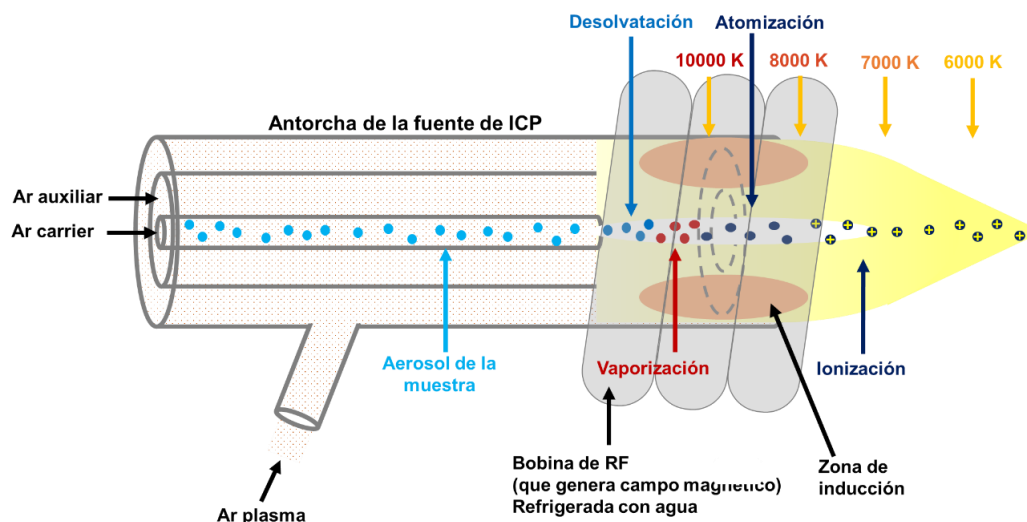


Figura A.17. Esquema de la antorcha y de los diferentes procesos que ocurren dentro de la fuente ICP.

La temperatura del plasma oscila entre 6000-10000 K dependiendo de la región. A medida que el aerosol de la muestra atraviesa el plasma, las gotas sufren una serie de procesos fisicoquímicos que empiezan por la pérdida de agua. Tras la desolvatación, la muestra se vaporiza, atomiza e ioniza, siendo el grado de ionización de cada elemento dependiente de su energía de ionización y de las condiciones de temperatura y densidad electrónica del plasma.¹⁴⁶ Dado que el argón presenta una alta energía de ionización (15.76 eV) y que casi la totalidad de los elementos tienen una primera energía de ionización menor de 9 eV prácticamente la mayoría de los elementos se ionizan por encima del 90 % en el plasma dando lugar a iones monopositivos. Ciertos elementos cuya segunda energía de ionización es baja pueden formar iones doblemente cargados. Incluso, se pueden llegar a formar especies poliatómicas por reacción de los analitos con el argón, con los gases atmosféricos o con otros iones presentes en la muestra. La formación de las especies poliatómicas debe ser minimizada para evitar interferencias espectrales.

➤ Interfase de extracción y sistema de focalización

Poner en contacto el plasma caliente a presión atmosférica con el analizador de masas a alto vacío (10^{-6} bar) fue uno de los retos más complicados a abordar en el desarrollo del ICP-MS. Para evitar la pérdida de presión que sufre el haz de iones desde su generación en el plasma hasta el analizador, se diseñó una interfase de extracción de iones que permite corregir este gradiente. Esta interfase está constituida por dos piezas metálicas (comúnmente de Ni, aunque

pueden ser de otros materiales como Pt) en forma de conos, cuya función principal es la de extraer los iones y facilitar la transferencia hacia el analizador de masas (Figura A.18).

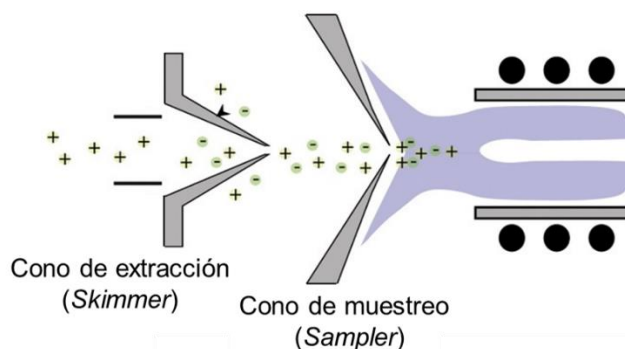


Figura A.18. Región de la interfase en un ICP-MS adaptado de Farnsworth et al.¹⁴⁷

El cono que está en contacto con el plasma se denomina cono de muestreo o más comúnmente “sampler”, mientras que el segundo cono es conocido como cono de extracción o “skimmer”. Ambos, están separados por una cámara de expansión que se encuentra a 10^{-3} bar, una presión intermedia entre el plasma y el alto vacío del analizador de masas. La caída de presión tras el *skimmer* provoca la difusión de los electrones y origina un haz de iones cargado positivamente. La carga neta positiva del haz provoca la repulsión mutua entre los iones. Por ello, modulando los voltajes de trabajo de las lentes se evita la repulsión y pérdida de los cationes de interés y se favorece su transmisión hacia el plasma.

- Factores que afectan a la precisión y exactitud en la fuente de ICP en la medida de relaciones isotópica

La exactitud y precisión en la medida de relaciones isotópicas de un elemento está afectada por varios factores:

- **Blancos.** La medida de la composición isotópica de un blanco representativo debe llevarse a cabo al principio o varias veces a lo largo de la sesión de medida con el fin de identificar el fondo y sustraer su contribución a la señal correspondiente del analito. Por tanto, lo más importante es minimizar la contribución del blanco para no tener que realizar correcciones matemáticas.

- **Interferencias.** Las interferencias espectrales pueden ser isobáricas (elementos con isotopos de la misma masa nominal que el analito) o poliatómicas (debido a la formación en la fuente ICP de iones poliatómicos de la misma masa nominal que el analito). La contribución de estas interferencias depende considerablemente de las condiciones de operación instrumentales y de la composición de la muestra.¹⁴⁸

- **Discriminación de masas.** Se produce debido a la transmisión diferencial de los iones cuando atraviesan la interfase en su camino hacia el analizador.¹⁴⁹ Se atribuye a dos procesos físicos: el efecto “orificio” y el efecto “espacio-carga”. El efecto “orificio” se da cuando el haz iónico llega a la interfase entre el cono de muestreo y el de extracción. En esa zona hay una caída de presión que hace que los iones se expandan en función de su energía cinética. Como los más ligeros presentan menor energía cinética, tienden a expandirse alejándose del centro haz iónico y desapareciendo por el sistema de vacío. Una vez que el haz de iones atraviesa el cono de extracción el efecto “espacio-carga” cobra una mayor importancia. El haz se encuentra positivamente cargado, por lo que los iones se repelen fuertemente entre sí.¹⁵⁰ Como los iones ligeros exhiben menor energía cinética, son eliminados más fácilmente por repulsión, mientras los más pesados permanecen en el haz. Ambos efectos dan como resultado la transmisión preferencial de los iones pesados frente a los ligeros, por lo que el haz estará enriquecido en los iones pesados. Este efecto se corrige mediante el empleo de modelos matemáticos que emplean la diferencia de masas entre dos isótopos y un factor de corrección de la discriminación de masas. En la Tabla A.7 se muestran las cuatro ecuaciones generalmente empleadas en la corrección de la discriminación de masas.¹⁵¹ En la mayoría de las ocasiones, el cálculo del factor de discriminación de masas requiere la medida de materiales de composición isotópica conocida. Cuando se realizan medidas de relaciones isotópicas de alta precisión mediante equipos multicolectores, el cálculo del factor de discriminación de masas debe realizarse a partir de la medida de materiales de referencia cuya composición isotópica haya sido certificada por un Instituto Nacional de Metrología.

Tabla A.7. Ecuaciones para la corrección de la discriminación de masas extraídas de García Alonso y Rodríguez-González .¹⁵¹

Modelo de corrección	Ecuación para la corrección	Ecuación para la determinación del factor de discriminación de masas (K)
Lineal	$R_{corr} = \frac{R_{exp}}{1 + K + \Delta M}$	$\frac{R_{exp} - R_{teor}}{R_{teor}} = K \times \Delta M$
Potencial	$R_{corr} = R_{exp} \cdot (1 + K)^{\Delta M}$	$\log\left(\frac{R_{teor}}{R_{exp}}\right) = \log(1 + K) \times \Delta M$
Exponencial	$R_{corr} = R_{exp} \cdot e^{K \times \Delta M}$	$\ln\left(\frac{R_{teor}}{R_{exp}}\right) = K \times \Delta M$
Ecuación de Russell	$R_{corr} = R_{exp} \cdot \left(\frac{m_i}{m_j}\right)^f$	$\log\left(\frac{R_{teor}}{R_{exp}}\right) = K \times \log\left(\frac{m_i}{m_j}\right)$

. **Estabilidad del haz de iones:** Las inestabilidades del sistema de introducción de muestra y de la fuente de ICP ocasionan fluctuaciones que afectan a la estabilidad del haz de iones. ellas inestabilidades del sistema de introducción de muestra, se pueden minimizar modificando la bomba peristáltica, la cámara de nebulización, el nebulizador o incluso proceder a la introducción por autoaspiración si el sistema de introducción de muestra lo permite. En el caso de las fluctuaciones debidas a la fuente ICP, éstas se deben en la mayoría de las ocasiones a la matriz de la muestra como por ejemplo un alto contenido en sales o en disolventes orgánicos cuando se acoplan técnicas cromatográficas.

- **Estadística de conteo de iones:** Cuando se usa un multiplicador de electrones como detector en lugar de una copa de Faraday, la precisión en la medida de una relación isotópica está limitada en parte por la estadística de conteo de iones, la cual es proporcional a la raíz del número total de cuentas medidas..¹⁵¹ Esto significa que para conseguir una adecuada precisión en la medida de las relaciones isotópicas, ha de alcanzarse un valor umbral de cuentas por segundo.¹⁵² Por tanto la incertidumbre de

las relaciones isotópicas disminuirá al emplear equipos de elevada sensibilidad o al aumentar la concentración del analito.

- **Perfil de los picos isotópicos.** La forma de los picos isotópicos es muy diferente en función del espectrómetro de masas utilizado. En los equipos de tipo cuadrupolo, la medida debe llevarse a cabo exactamente en el máximo del pico para conseguir precisiones adecuadas: pequeñas variaciones en la posición en el eje m/z durante la adquisición conducen a variaciones significativas de la intensidad de la señal provocando un empeoramiento en la precisión de las relaciones isotópicas. En cambio, los equipos ICP-MS de doble enfoque generan picos trapezoidales cuando se trabaja en baja resolución, por lo que ligeras variaciones en la calibración de masas no tendrán una influencia tan severa en la precisión de las relaciones isotópicas. Sin embargo, el paso de baja a media resolución conlleva un empeoramiento en la eficacia de la transmisión iónica, lo que provoca un cambio en la forma del pico de trapezoidal a triangular dando como resultado precisiones típicas de los ICP-MS de tipo cuadrupolo.
- **Perfil de la señal analítica.** De manera general, la precisión que se alcanza en la medida de relaciones isotópicas en señales continuas y constantes es superior a la obtenida en señales que varían en función del tiempo (señales transientes). Estas últimas proceden del acoplamiento del equipo ICP-MS como detector a técnicas de introducción de muestras alternativas a la nebulización convencional, como son técnicas cromatográficas como la cromatografía de gases (GC), de líquidos (HPLC) o la electroforesis capilar (CE) o técnicas de introducción de muestras sólidas como la ablación láser (LA). En estos casos la intensidad de la señal obtenida para cada m/z varía en función del tiempo, y el tiempo de integración deberá ajustarse en función de la duración de la señal y el número de isótopos medidos para poder seguir el perfil de pico adecuadamente para cada m/z .

A.2.2.2. Fuente de ionización electrónica

La fuente de ionización electrónica genera iones moleculares o fragmentos iónicos moleculares. Esta fuente de ionización se acopla fundamentalmente a la GC; y a analizadores de tipo cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF) y sector magnético (SF). Consiste en una cámara a alto vacío ($<10^{-6}$ mbar), con un filamento de wolframio. Los electrones son generados por emisión térmica del filamento caliente y son atraídos por un potencial, normalmente de 70 eV, que se aplica entre el filamento y un ánodo colector (Figura A.19).

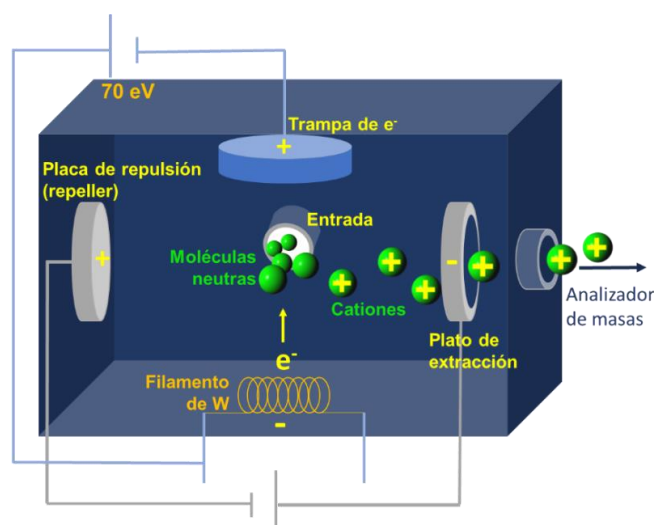
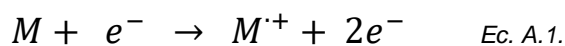


Figura A.19. Representación de la fuente de impacto electrónico.

Las trayectorias de los electrones y las moléculas son perpendiculares de modo que los electrones al colisionar con las moléculas orgánicas, las ionizan de acuerdo con la ecuación A.1, causándoles la pérdida de electrones por repulsión electrostática.



Los iones positivos formados son atraídos por una placa de aceleración y repelidos por una placa de repulsión (*repeller*) mediante una diferencia de potencial aplicada entre ambas con objeto de introducirlos en el analizador de masas. En la colisión con los electrones, debido a repulsiones electrostáticas se forman cationes radicales de los analitos M^+ que son muy útiles puesto que proporcionan información sobre el peso molecular del analito. Su estado como radicales hacen que sean muy inestables y que sufran fragmentaciones en mayor o menor

medida en función de su estructura. Estas fragmentaciones son también muy útiles puesto que aportan información estructural sobre la molécula inicial. Para la mayoría de las moléculas orgánicas, el rendimiento de ionización dentro de la fuente es máximo en la región de los 70 eV y la fragmentación producida es reproducible independientemente del instrumento empleado. Esto facilita la existencia de bibliotecas universales de fragmentación, que pueden ser utilizadas para realizar identificaciones rápidas y fiables de compuestos desconocidos.

A.2.3. Analizadores de masas

A.2.3.1. Cuadrupolo

El analizador de masas de tipo cuadrupolo, o filtro de masas cuadrupolar, fue patentado en el año 1953, y es desde entonces es el analizador de masas más empleado en laboratorios de rutina, debido a su robustez y bajo coste en comparación con otros equipos. El analizador consta de cuatro barras cilíndricas o hiperbólicas de metal, conductoras, alineadas paralelamente entre sí y equidistantes de un eje central imaginario (Figura A.20). Cada pareja de barras opuestas está conectada entre sí formando dos pares de electrodos. A cada par se le aplica una combinación de corriente continua (DC) y voltajes de radiofrecuencia (RF): se mantiene un par a $+U+V \cdot \cos(\omega t)$ y el adyacente a $-U-V \cdot \cos(\omega t)$. Esto hace que se establezca un campo hiperbólico oscilante entre las cuatro barras, a través del cual pasarán los iones. La magnitud de las oscilaciones de cada ion dentro de este campo vendrá definida por su relación m/z , por lo que para una combinación de voltajes DC-RF determinada, sólo los iones con cierta m/z mantendrán una trayectoria estable a lo largo del cuadrupolo y llegarán al detector. Los demás iones perderán la trayectoria chocando con las superficies del cuadrupolo y serán expulsados del haz.¹⁵³

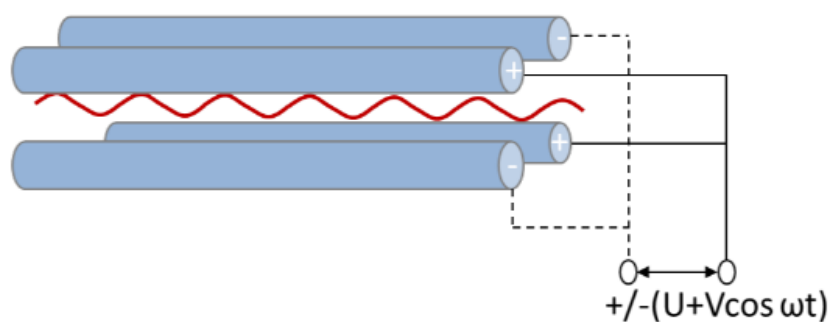


Figura A.20. Representación del analizador de tipo cuadrupolo.

Generalmente, los filtros de masas cuadrupolares permiten una alta velocidad de barrido en un amplio rango de masas de trabajo. En un análisis cualitativo se barre prácticamente todo el espectro de masas, mientras que para análisis cuantitativos y medida de relaciones isotópicas se fijan las masas de interés y el cuadrupolo va saltando de una a otra. La resolución ($M/\Delta M$) que se alcanza es baja (300-400), pero se considera suficiente para muchas aplicaciones que no presentan interferencias espectrales. En estos casos existen mejoras instrumentales, como pueden ser las celdas de colisión o los equipos de triple cuadrupolo para realizar espectrometría de masas en tándem.

A.2.3.1. Analizador de sector magnético

La mayoría de los instrumentos utilizados para la determinación de relaciones isotópicas con alta precisión son de tipo sector magnético. Su funcionamiento se basa en la dispersión provocada por campos magnéticos sobre el haz de iones, de un modo parecido a como lo hacen los prismas con la radiación visible. El haz de iones se separa según su relación masa -carga- al atravesar un analizador de sector magnético. El analizador consta de un imán con dos placas que aplican un campo magnético (B) perpendicular a la trayectoria de los iones. Los iones, por tanto y según se muestra en la Figura A.21, estarán sometidos a un par de fuerzas de igual magnitud, pero sentido contrario: la fuerza de Lorentz (F_L) y la fuerza centrípeta (F_c), .

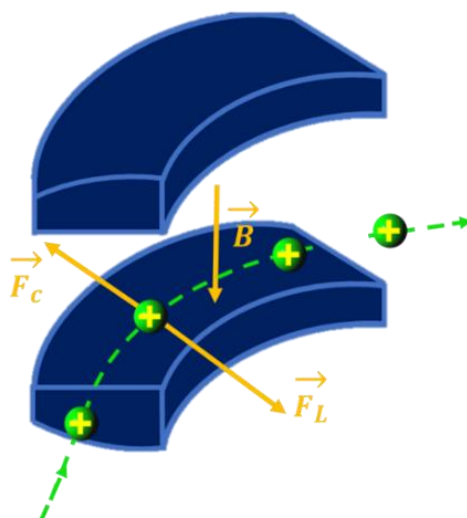


Figura A.21. Representación de un analizador de sector magnético.

Igualando las expresiones de ambas fuerzas, podemos obtener la magnitud del radio iónico en función de la relación masa/carga de ese ion (Ecuación A.2).¹⁵³

$$r_{ion}^2 = \frac{m}{z} \frac{2U_0}{B_0^2 \cdot e} \quad \text{Ec. A.2.}$$

El analizador de campo magnético focaliza los iones en función de su relación m/z en diferentes puntos sobre una rendija tras la cual se sitúa el detector. Si se dispone de un sistema de detección con multicolección, cada uno de los iones de interés puede incidir en uno de los colectores (copas de Faraday o contadores de iones) de forma simultánea lo cual permite la medida muy precisa de relaciones isotópicas.

A.2.3.1. Analizador de doble enfoque

A finales de los años 80, las limitaciones en el poder de resolución de interferencias poliatómicas en los analizadores de tipo cuadrupolo, favorecieron el desarrollo de equipos de doble enfoque basados en el uso de un sector magnético como analizador de masas. Su alto poder de resolución permitió la separación de interferencias poliatómicas hasta entonces difíciles de resolver por un cuadrupolo. Como se ha comentado en el apartado anterior, la precisión de los instrumentos de sector magnético mejora con el acoplamiento de un sector electrostático. La trayectoria de los iones en un sector magnético no depende solo de su relación masa carga sino también de su velocidad. Por tanto, iones de una misma masa carga pueden tener trayectorias distintas lo cual reduce significativamente la resolución de masas. Para obtener alta resolución el analizador de masas debe componerse de un sistema de doble enfoque, de forma que primero se realice una filtración por energías, y posteriormente una dispersión en función de la relación masa/carga. Se denomina de doble enfoque puesto que presenta dos sistemas de focalización de iones diferentes colocados de forma secuencial, en los que los iones son doblemente focalizados en las correspondientes rendijas. El sector electrostático, actúa como filtro de energía focalizando los iones a la entrada del imán.

A finales de los años 80, las limitaciones en el poder de resolución de interferencias poliatómicas en los analizadores de tipo cuadrupolo, favorecieron el desarrollo de equipos de

doble enfoque basados en el uso de un sector magnético como analizador de masas. Su alto poder de resolución permitió la separación de interferencias poliatómicas hasta entonces difíciles de resolver por un cuadrupolo. Como se ha comentado en el apartado anterior, la precisión de los instrumentos de sector magnético mejora con el acoplamiento de un sector electrostático. La trayectoria de los iones en un sector magnético no depende solo de su relación masa carga sino también de su velocidad. Por tanto, iones de una misma masa carga pueden tener trayectorias distintas lo cual reduce significativamente la resolución de masas. Para obtener alta resolución el analizador de masas debe componerse de un sistema de doble enfoque, de forma que primero se realice una filtración por energías, y posteriormente una dispersión en función de la relación masa/carga. Se denomina de doble enfoque puesto que presenta dos sistemas de focalización de iones diferentes colocados de forma secuencial, en los que los iones son doblemente focalizados en las correspondientes rendijas. El sector electrostático, actúa como filtro de energía focalizando los iones a la entrada del imán.

La configuración de estos equipos de doble enfoque varía según la posición de los sectores magnético y eléctrico. Se puede emplear configuración Nier-Johnson directa, si el haz de iones se encuentra primero con el sector electrostático, o inversa, si se encuentra primero con el sector magnético. Para la medida precisa de relaciones isotópicas los equipos con configuración directa son los más apropiados, ya que la colocación del imán por detrás del sector electrostático permite la detección simultánea de múltiples iones a la salida del analizador. Mientras, los equipos con configuración reversa, en los que el imán se coloca por delante del sector electrostático, permiten una detección simple, y son empleados en el análisis de elementos trazas en aplicaciones que requieren buena sensibilidad y resolución. El instrumento MC-ICP-MS empleado en esta Tesis Doctoral presenta una configuración Nier-Johnson directa.¹⁵⁴ Esta disposición consiste en un analizador de campo electrostático radial colocado con una desviación de $\pi/2$ rad, combinado con un analizador de campo magnético a una desviación de $\pi/3$ rad, tal y como se muestra en la Figura A.22.

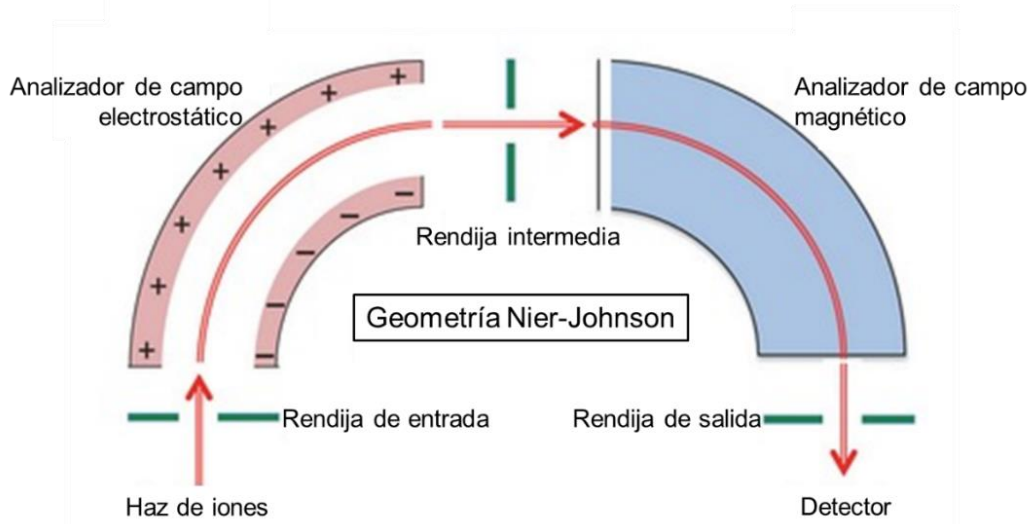


Figura A.22. Representación de un analizador de doble enfoque con Geometría Nier-Johnson adaptado de Wiedenbeck *et al.*¹⁵⁴

El sector electrostático se compone de dos placas cilíndricas curvadas formando un ángulo de 90° con potenciales de la misma magnitud, pero de signo contrario. La placa interna tiene una polaridad negativa que atrae los iones, mientras que la externa con polaridad positiva los repele. Esta característica hace que los iones que se encuentran sometidos a dicho campo experimenten una trayectoria circular gobernada por un par de fuerzas perpendiculares entre sí como se muestra en la Figura A.23.

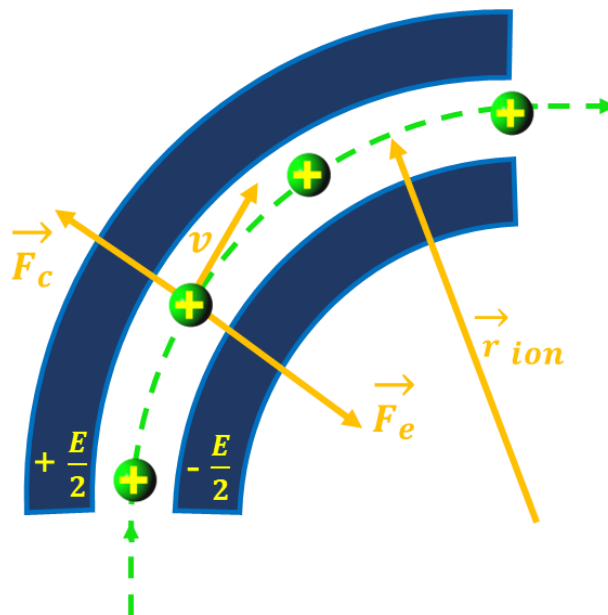


Figura A.23. Representación de un sector electrostático.

Igualando las expresiones de ambas fuerzas, se obtiene que la magnitud del radio iónico también es función de la relación masa-carga al aplicar un campo eléctrico:

$$r_{ion} = \frac{m \cdot v^2}{z \cdot e \cdot E_0} \quad \text{Ec. A.3}$$

A partir de esta ecuación se observa que los iones describen una trayectoria dada por r_{ion} que depende del potencial de campo aplicado y de la energía cinética, no de su relación m/z . Esto hace que todos los iones que posean una energía cinética equivalente sean focalizados en un mismo punto de la rendija intermedia que precede al sector magnético. A la salida, los iones atraviesan una rendija intermedia cuya función es estrechar la gama de energías cinéticas del haz iónico antes de entrar en la región del electroimán. Una vez en ella, los iones se someten a un campo magnético perpendicular a su vector velocidad, que consigue separarlos en función de su momento, como se ha detallado en la sección anterior. La rendija se emplea como filtro de iones previo a la separación que se producirá en el imán. Los iones llegan con un amplio rango de Energía traslacional, por tanto, pasamos a un rango más estrecho de Energía cinética. De esta manera, para un valor de campo magnético determinado solamente aquellos iones con cierta relación m/z siguen una trayectoria estable a lo largo del imán en su camino hacia el detector. El poder de resolución de este tipo de analizadores es modulable según las necesidades de los analitos. La resolución se ajusta con la anchura de la rendija de entrada al espectrómetro de masas y la rendija de salida hacia el detector. Cuando la anchura es grande se trabaja a baja resolución ($R = 300-400$) y a medida que la anchura va disminuyendo se puede trabajar en media ($R = 3000-4000$) o alta resolución ($R = 8000-10000$). En función del modo de resolución elegido, la focalización y energía del haz de iones serán moduladas para que los iones puedan pasar o no a través de las rendijas. Es importante destacar que estos equipos no pueden resolver interferencias isobáricas elementales, que requieren normalmente una resolución mayor de 10000.

A.2.4. Detectores de iones

Tras su paso por el analizador de masas los iones salen separados en función de su m/z e impactan sobre la superficie del detector generando una señal electrónica medible. Los detectores más comunes en aplicaciones de ICP-MS son el multiplicador de electrones secundarios (SEM) y las copas de Faraday. Los detectores operan bajo dos modos de medida: el modo analógico, en el que se realiza la medida directa de la corriente eléctrica generada en el detector, y el modo digital, basado en la medida del número de iones que llegan al detector por unidad de tiempo. El modo digital es mucho más sensible que el analógico. No obstante, la mayoría de los detectores pueden utilizar ambos modos de medida en función de la corriente iónica incidente.

A.2.4.1. Multiplicador de electrones secundarios

El multiplicador de electrones secundarios (SEM) está formado por una sucesión de electrodos, denominados dínodos, que están sometidos a potenciales crecientes positivos. Cada ion que sale del analizador colisiona con la superficie del primer dínodo multiplicando el número de electrones secundarios, que son rápidamente atraídos por el siguiente dínodo. Esto origina una cascada de electrones que se va amplificando a lo largo de la sucesión de dínodos como se ilustra en la Figura A.24.

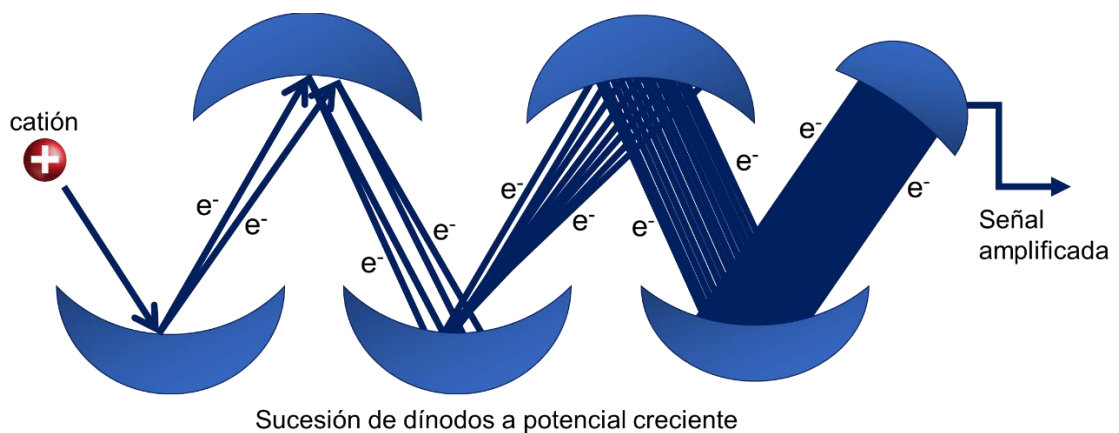


Figura A.24. Representación de la amplificación de la señal en un detector SEM.

Contando los pulsos generados por la llegada de cada ion al detector, el sistema registra digitalmente la intensidad del haz de iones en términos de cuentas por segundo. También se puede emplear un multiplicador en un modo analógico, en el que la corriente de salida se mide con un electrómetro, como cualquier corriente pequeña. Los detectores tipo SEM son muy adecuados para el análisis multielemental a niveles traza y ultratrazo debido a su alta sensibilidad. Además, presentan una vida útil considerablemente larga y son fácilmente reemplazables.

Estos detectores presentan un tiempo muerto a la hora de realizar la detección de los iones. El tiempo muerto es característico de los detectores secuenciales, que registran la señal a través de pulsos, como es el caso de los multiplicadores de electrones. Ese define como la diferencia de tiempo que requiere el sistema electrónico de un detector para registrar la llegada de dos iones consecutivos. El detector registra por tanto menos iones de los que le llegan, y eso afecta especialmente en procesos de altas tasas de conteo (mayor de 10^6 cuentas·s⁻¹), donde provoca una pérdida de linealidad en las intensidades o errores en la medida de relaciones isotópicas. El tiempo muerto es característico de cada detector y debe medirse, corregirse e incluirse regularmente en el software cada vez que se reemplace.¹⁵⁵

A.2.4.1. Copas de Faraday

Las copas de Faraday consisten en un electrodo, normalmente en forma de copa o caja, que recibe el impacto de los iones transmitidos desde el analizador. A medida que van llegando iones positivos a cada placa, se origina un flujo de electrones para neutralizar su carga, siendo esta señal eléctrica la que se amplifica y se registra. La señal se mide como una corriente analógica igual o superior a la corriente iónica original, dependiendo de la forma del electrodo como se ilustra en la Figura A.25. El tiempo muerto del detector no afecta en detectores analógicos (copas de Faraday) ya que éstos miden la intensidad neta de la corriente eléctrica generada y no el número de pulsos por unidad de tiempo. Esto hace de las copas de Faraday sean la opción más adecuada para la medida de relaciones isotópicas con alta precisión, ya que este tipo de colectores no sufren efectos de tiempo muerto, siempre y cuando se sacrifique en cierta medida la sensibilidad requerida.

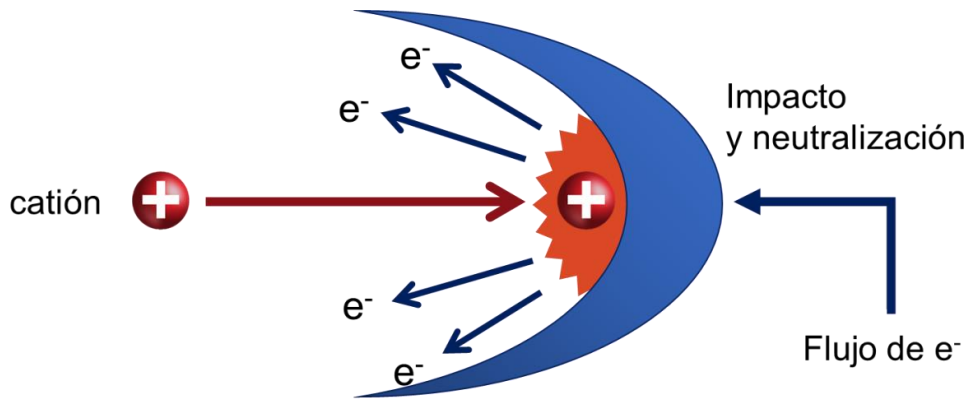


Figura A.25. Representación de la detección de iones en una copa de Faraday.

Las copas de Faraday pueden emplearse en un sistema de detección por multicolección. El sistema de multicolección se basa en el uso de diversas copas de Faraday, cada una de ellas conectada al potencial base a través de una resistencia elevada (Figura A.26). Este sistema permite la detección simultánea de los iones con elevada precisión.

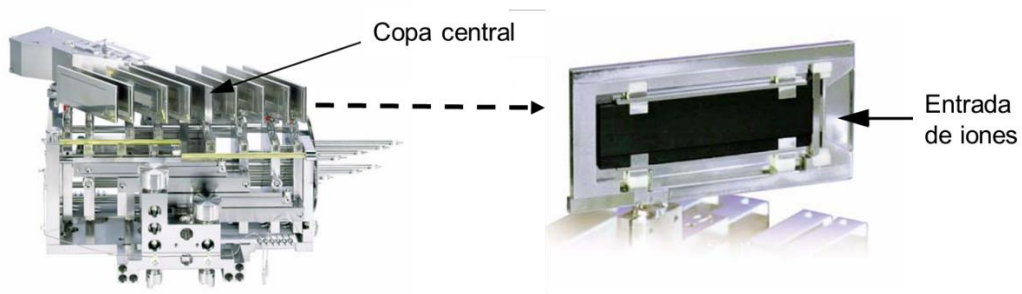


Figura A.26. Copas de Faraday del instrumento Neptune Plus de ThermoScientific.

El sistema de multicolección con varias copas de Faraday para realizar una detección simultánea no está exento de error. Aunque la detección se puede considerar simultánea, muchos estudios han encontrado una falta de sincronización en la respuesta de las copas de Faraday. Esta desviación se atribuye a la posibilidad de una transferencia diferencial de los isótopos en función de su masa.¹⁵⁶⁻¹⁵⁹ que parece estar causada por el sistema amplificador de las copas de Faraday.^{160,161} Este fenómeno se explica por la respuesta lenta del sistema amplificador, que puede variar entre los colectores individuales al medir los cambios rápidos en la entrada de los iones. Esta desviación es más pronunciada en el caso de la medida de señales transientes, dónde el cambio de intensidad es más brusco y puede ser corregida mediante modelos matemáticos específicos.¹⁶²

A.3 Acoplamiento de la cromatografía de gases a la espectrometría de masas

A.3.1. Cromatografía de gases

La IUPAC (1974) definió la cromatografía como “un método físico de separación en que los componentes que se van a separar se distribuyen entre dos fases, una fija (la fase estacionaria) y otra que se desplaza con una dirección definida (la fase móvil)”. En cromatografía de gases la muestra es inyectada en para ser volatilizada y a continuación introducida en el flujo de gas portador que atraviesa la columna. Esta característica requiere que los analitos sean volátiles o volatilizables, es decir, que puedan derivatizarse químicamente transformándolos en una especie volátil. Una vez en columna la elución de la muestra se lleva a cabo por arrastre de un gas inerte, que no interacciona con la fase estacionaria y cuya única función es el transporte de los analitos ¹⁶³. En la Figura A.27 se muestra una representación de los principales componentes de un cromatógrafo de gases.

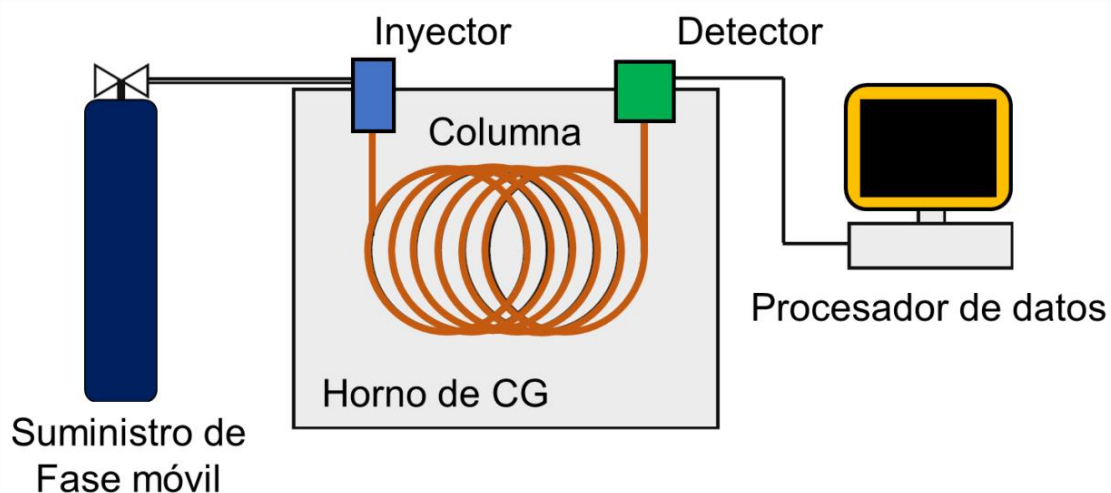


Figura A.27. Esquema de un cromatógrafo de gases con sus principales componentes.

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado la Cromatografía de Gases como técnica de separación y como sistema de detección se han empleado distintos analizadores de masa equipados con una fuente ICP o con una fuente de ionización electrónica.

A.3.2. Acoplamiento GC-EI-MS

Cuando se utiliza un sistema híbrido de cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas, éste actúa como detector tras la separación por GC. Por tanto, los analitos deben transportarse desde la salida de la columna cromatográfica al espectrómetro de masas. Esta transferencia tiene que realizarse sin que los analitos condensen o descompongan antes de alcanzar la fuente de ionización. Para ello se requiere una interfase de unión entre la salida de la columna de GC y la fuente de ionización. La interfase abarca desde la salida de la columna hasta la entrada en la fuente de ionización del espectrómetro de masas. El flujo total que entra en la fuente de ionización electrónica no debe desestabilizar el vacío al que se encuentra tanto el espectrómetro de masas como la fuente. La interfase debe mantener a su vez, la resolución cromatográfica obtenida tras la separación cromatográfica.

El sistema GC-MS con fuente de ionización electrónica está ampliamente establecido tanto en laboratorios de rutina como de investigación para la determinación de mezclas de compuestos volátiles en muestras biológicas o medioambientales. Existen varios diseños de interfaces GC-MS en función de la aplicación y del fabricante del instrumento ¹⁶⁴. Actualmente, en los instrumentos más modernos con columnas capilares de GC, la interfase más utilizada es un tubo metálico equipado con un controlador de temperatura. La columna de GC se conecta a un tubo de sílice fundida, insertado dentro de la interfase calentada y que entra directamente en la fuente de ionización. La representación de esta interfase se muestra en la Figura A.28.

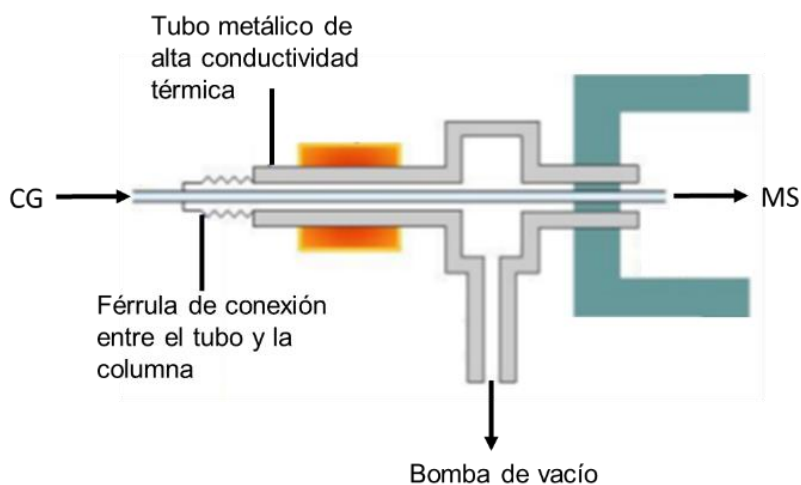


Figura A.28. Representación de la interfase en GC-EI-MS.

Este diseño tiene como ventaja una en la transferencia de los analitos desde la columna de GC hasta la fuente de ionización ¹⁶⁵. En el caso de grandes volúmenes pueden utilizarse otras interfases de división abierta (Open-split) o de separador de flujo (*Jet separator*) ¹⁶⁶.

A.3.3. Acoplamiento de la cromatografía de gases al ICP-MS

La hibridación de la cromatografía de gases con el ICP-MS permite realizar análisis de especiación elemental. En comparación con GC-MS las ventajas de este acoplamiento son la alta selectividad (solamente se detectan compuestos que contengan el heteroátomo de interés) y su alta sensibilidad. El primer trabajo de este sistema híbrido se presentó en el año 1986, ^{167,168} para el análisis de compuestos orgánicos. El primer prototipo diseñado por Van Loon *et al.* consistía en conectar la salida de la columna a la base de la antorcha con una línea de transferencia de pequeña longitud. Existen dos configuraciones principales para a la hora de diseñar una interfase GC-ICP-MS. La primera de ellas sería la interfase directa que se conecta desde la salida de la columna a la antorcha y la otra sería empleando el aerosol generado en la cámara de nebulización para la transferencia. ¹⁶⁹ Ambos tipos de diseños se detallarán a continuación.

A.3.3.1 Interfase directa GC-ICP-MS

En esta configuración se retira la cámara de nebulización y se conecta una línea de transferencia desde la salida de la columna de GC hasta la antorcha, con lo que los analitos son dirigidos directamente al plasma. La ausencia del aerosol en el plasma limita las pérdidas de energía que se producen por efecto de la desolvatación y vaporización. Esto se traduce en una mayor sensibilidad y también en una reducción de las posibles interferencias causadas por la disolución. Este tipo de acoplamiento genera lo que se denomina un plasma “seco”, donde no introducimos ningún aerosol en fase líquida.

Para garantizar la eficiencia en la transferencia de los analitos, estas interfases pueden ser calentadas en su totalidad o parcialmente. De este modo pueden emplearse en la

determinación de analitos volátiles con puntos de ebullición relativamente bajos, que puedan sufrir condensación en la línea antes de llegar al plasma. El primer diseño de interfase totalmente calentada fue presentado por Pretorius *et al.*¹⁷⁰ Consistía en un tubo de acero calentado hasta 400°C por el que pasaba un capilar de GC. Este tubo iba alojado en un inyector que llegaba a unos 24 mm del plasma. Otro diseño, empleaba una manta calefactora para calentar un tubo de Cu de un metro ¹⁷¹. Además, se situaba una resistencia Ni-Cr con el objetivo de controlar la temperatura. Un diseño comercial de Agilent se basaba en un tubo flexible de 1m que se calentaba a través de una resistencia y que al final del tubo se encuentra un tramo rígido de 10cm que se introduce en la antorcha.¹⁷² Además, este diseño permitía que Ar se precalentase haciéndolo pasar a través de una bobina que era calentada dentro del horno de GC.

Otro tipo de interfases son las parcialmente calentadas que, aunque no previenen la condensación, son útiles para el transporte de determinados analitos cuyo punto de ebullición es suficientemente bajo para no condensar fácilmente a T ambiente. En estos diseños se suele calentar la zona en la que se mezcla el flujo de gas portador que sale de la columna del GC con el flujo de gas de arrastre. Kim *et al.* propusieron un diseño con un cilindro calentado de Al de 60cm que recubría el capilar ¹⁷³. Smaele *et al.* diseñaron una línea calentada sólo en una última zona con un tubo de acero calentado mediante una resistencia eléctrica que también calentaba el Ar ¹⁷⁴. Esta línea de transferencia no mostraba colas en los picos de los analitos y tenía la ventaja de que era de fácil montaje.

Otro diseño consistió en un bloque calentado situado a la salida de la columna cromatográfica. En este bloque se mezcla el Ar procedente del ICP-MS con el flujo de la fase móvil del GC, como se muestra en la Figura A.29. El transporte de los analitos se realiza a través de un tubo flexible de PFA (perfluoroalcoxi) que se introducía directamente en el canal central de la antorcha.¹⁷⁵ Esta interfase se utilizó con éxito para compuestos organometálicos de Se, S, Pb, Hg and Sn.

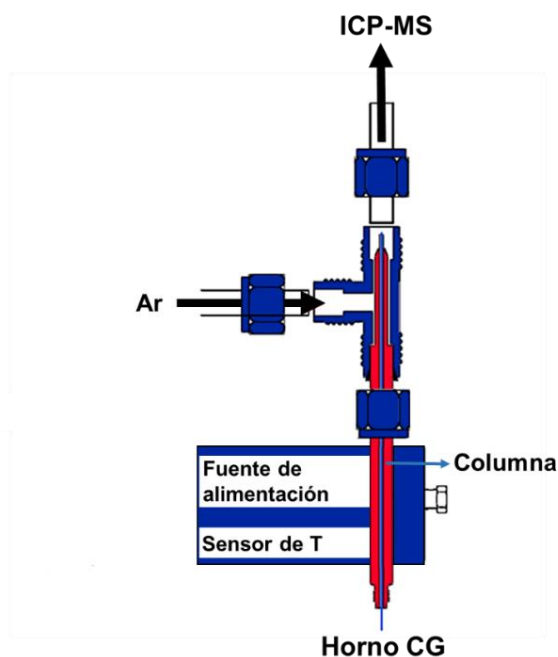


Figura A.29. Representación de la interfase GC-ICPMS adaptada de Montes-Bayón et al. ¹⁷⁵

En último lugar, estarían las interfases no calentadas, que se encontrarían a T ambiente. Este tipo de interfases se han utilizado para transportar analitos con elevada volatilidad, que no sufren peligro de condensación. Algunos ejemplos de aplicación sería la determinación de especies alquiladas de Hg, Pb, Sn y Ge.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸

A.3.3.2. Interfases GC-ICP-MS a través de la cámara de nebulización

En este tipo de interfases la cámara de nebulización se conecta con la línea de transferencia del GC. Esto da lugar a la formación de un plasma “húmedo”. El primer prototipo pretendía solventar los problemas de montaje de la interfase, ya que mediante una válvula de volumen muerto cero se podía seleccionar el flujo de GC o del aerosol.¹⁷⁹ Feldmann *et al.* (1994) propusieron un diseño en el que el flujo procedente del GC se mezclaba en una conexión en T con el aerosol, asegurando condiciones de plasma estables. El capilar de transferencia se insertaba en el inyector de la antorcha y el aerosol se introducía a través de un nebulizador concéntrico tipo Meinhard convencional a través de una cámara de nebulización Scott o de doble paso.¹⁸⁰ La desventaja del sistema era la sensibilidad relativamente baja debido a la pérdida de

energía para la desolvatación del aerosol húmedo. Otro diseño similar fue presentado en el año 2001 por Krupp *et al.*, para la medida de relaciones isotópicas de Pb, empleando la nebulización de Tl para la corrección de la discriminación de masas a lo largo del cromatograma.¹⁵⁶

Cabe resaltar que la introducción de un aerosol formado en una cámara de nebulización al mismo tiempo que el flujo de gas de arrastre a la salida del GC permite la introducción de estándares que pueden emplearse para una mejor optimización de las condiciones instrumentales o para realizar procesos de corrección de discriminación de masas cuando se miden relaciones isotópicas por GC-ICP-MS. El segundo problema asociado al trabajo en condiciones de plasma seco, y sin introducción adicional de O₂, es la deposición de partículas de carbón en la superficie del cono, como se muestra en la Figura A.30. Esto se produce por la mala combustión de los disolventes orgánicos empleados en GC, y puede disminuir progresivamente la transferencia de los analitos. La introducción de un aerosol líquido de una disolución acuosa y por tanto las condiciones de plasma “húmedo” evita en gran medida esta deposición, ya que favorece combustión de la materia orgánica por la presencia de oxígeno en el aerosol.¹⁸¹

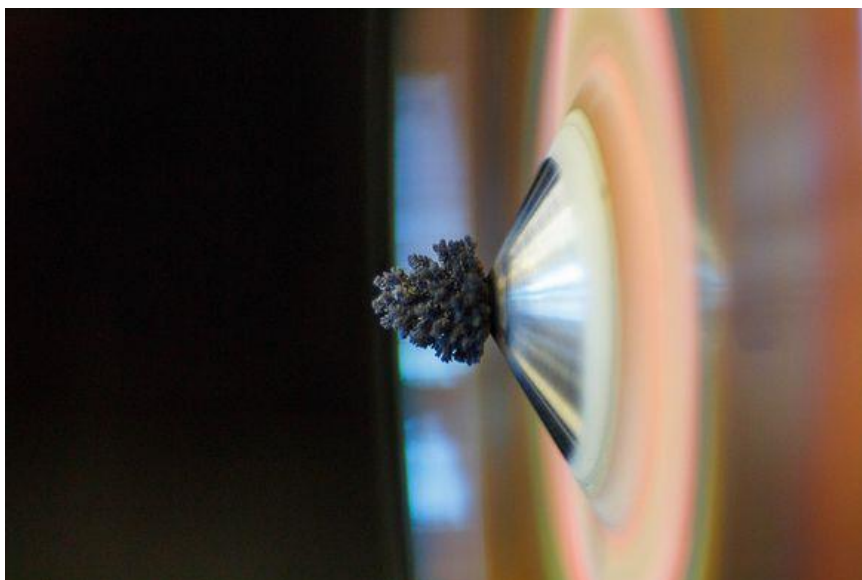


Figura A.30. Imagen de un cono de muestreo con partículas de carbón obturando el orificio.

A.4. Análisis por Dilución isotópica

A.4.1. Concepto de dilución isotópica

En 1895, C.G.J. Petersen publica un artículo sobre la captura, marcaje y devolución de peces Solla en el fiordo danés Limfjord.¹⁸² Su objetivo era estimar la población de esta especie utilizando los individuos marcados, que eran devueltos al ecosistema. Después de esperar un determinado periodo de tiempo, para que los peces marcados se mezclasen con el resto, se recapturaba un grupo de ellos. Estos peces capturados pertenecían tanto a los marcados como a los no marcados, lo que permitía establecer una proporción entre ellos, que sería equivalente en el total de la población en el fiordo. En 1933, el entomólogo C.H.N. Jackson, detalla un método análogo de captura-marcaje-recaptura para la estimación de la densidad de población del mosquito tse-tsé.¹⁸³ El experimento se llevó a cabo en el lago Tanganika, en una región en forma de raqueta, poco comunicada con el resto del lago. Estos trabajos dentro del campo de la biología y la ecología se basan en un principio común, un sistema “cerrado” en el que las especies marcadas y las no marcadas se encuentran en equilibrio.¹⁸⁴ El Análisis por Dilución Isotópica (IDA) se fundamenta en estos estudios de conteo. La técnica emplea los isótopos de los elementos a través de la medida de relaciones isotópicas, para cuantificar elementos o compuestos de una manera exacta y precisa.

El análisis por dilución isotópica consiste en modificar la composición isotópica de un compuesto o elemento dentro de una muestra, mediante la adición de ese compuesto o elemento con una composición isotópica enriquecida en uno de sus isótopos. La especie que se añade enriquecida isotópicamente se denomina trazador. Este fundamento se ilustra en la Figura A.31, para el caso de una pecera donde se encuentran un número desconocido de peces azules. Para realizar la cuantificación, se añade un número conocido de peces rojos a esa pecera de peces azules. Se espera a que se equilibren entre ellos en la pecera y se toma un grupo de esos peces. La proporción de peces en esa muestra será equivalente al total de peces en la pecera.

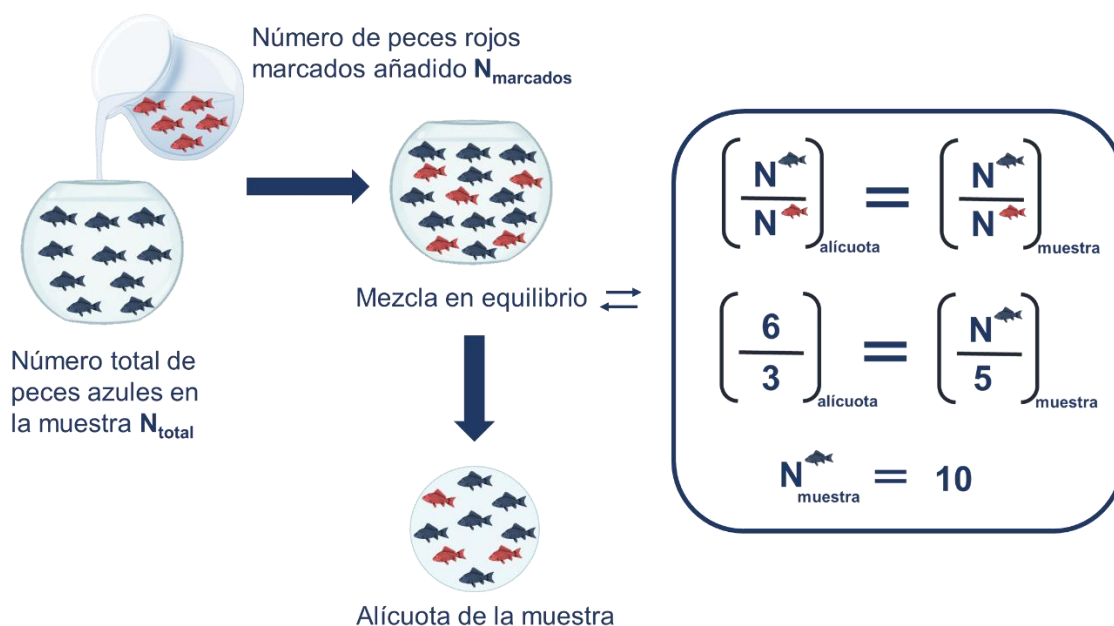


Figura A.31. Principio fundamental del análisis por dilución isotópica ilustrado en una pecera con peces marcados y no marcados.

En esta pecera, que simularía a un sistema cerrado, se echan 5 peces rojos, se espera a que se mezclen con los azules dentro de la pecera y se toma una muestra de 9 peces en total. En esta muestra, o alícuota, se encuentran 6 peces azules frente a 3 peces rojos. Como el total de peces rojos añadidos era de 5, se calcula que el total en la pecera será de 10 peces azules.

A.4.2. Análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas

George Hevesy (Premio Nobel de Química en 1943) fue pionero en la utilización de isótopos radiactivos como trazadores. Uno de sus primeros trabajos en este campo fue presentado en 1931, empleando ^{210}Pb radiactivo para determinar el contenido de Pb en rocas por electrogravimetría.¹⁸⁵ Los primeros trabajos en los que se emplean isótopos estables detalla el uso de ^2H o ^{15}N en aminoácidos marcados para cuantificar proteínas.^{186,187} En este campo fueron muy relevantes los trabajos de Urey (Premio Nobel de Química 1934) en el uso de isótopos estables a causa del descubrimiento en 1931 del deuterio (^2H).^{188,189} A partir de 1940, se comenzaron a utilizar los primeros trazadores de isótopos estables enriquecidos disponibles en ese momento el ^2H , ^{15}N , ^{13}C y ^{18}O .^{190,191} La Agencia de Energía Atómica (EEUU) desarrolló entonces un programa para la producción a gran escala de isótopos estables.¹⁹² Este incremento

en la producción de isótopos facilitó el desarrollo comercial y la implementación de espectrómetros, lo que permitió consolidar la técnica como herramienta analítica.

El análisis por dilución isotópica es un método de medida primario, que según el Comité Consultivo para la Cantidad de la Materia (CCQM por sus siglas en inglés) se define de la siguiente forma: *“Un método primario de medida es un método que tiene las más altas cualidades metrológicas, cuya operación puede ser completamente descrita y comprendida, por la cual una completa incertidumbre debe escribirse en términos del SI de unidades, y cuyos resultados son, por tanto, aceptados sin referencia a un estándar de la cantidad que es medida.”*¹⁹³

El método se basa en la alteración de las abundancias isotópicas naturales de un elemento en una muestra, por la adición del mismo elemento enriquecido en alguno de sus isótopos. Meija y Mester,¹⁹⁴ determinaron que la precisión en el análisis de compuestos de butilestaño aumenta en un orden de magnitud al utilizar IDMS respecto a otros métodos analíticos. En los últimos 8 años el número de publicaciones anuales sobre dilución isotópica se ha mantenido por encima de las 500, según la base de datos *Web of Science* (Figura A.32).

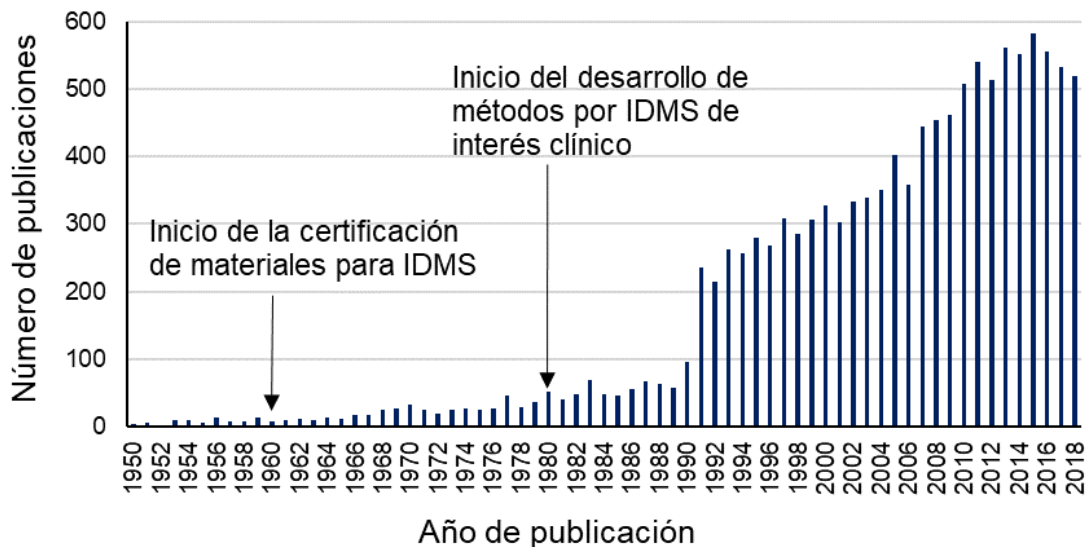


Figura A.32. Número de publicaciones por año para la búsqueda “Isotope Dilution” desde 1950 hasta 2018 (Fuente: *Web of Science*, Fecyt)

El análisis por dilución isotópica ha de cumplir una serie de requisitos, que en ocasiones pueden ser limitaciones de la técnica según el modo de trabajo:

- No deben producirse pérdidas de los analitos previas a que se produzca el equilibrio isotópico entre las especies marcadas (trazadores) y los analitos en la muestra. Esto hace que sea imprescindible que la mezcla tenga lugar al inicio del procedimiento analítico. En ciertas aplicaciones, la adición del trazador se realiza más adelante durante la preparativa o incluso (post-columna). En estas modalidades se requiere una evaluación del rendimiento del proceso hasta llegar a la mezcla con el trazador.
- Una vez que tiene lugar el equilibrio, el comportamiento de trazador y analito ante cualquier perturbación o transformación de dicho sistema en equilibrio deber ser equivalente para el analito y el trazador. Esto se presupone en un tipo de marcaje específico de la especie. Aunque, cuando el marcaje es inespecífico puede haber ligeras variaciones en el comportamiento de la especie.
- La medida de la relación isotópica debe realizarse en ausencia de interferencias espectrales. Las interferencias normalmente son controladas, o bien requieren del empleo de equipos de alta resolución. En caso de no poder eliminarse pueden corregirse matemáticamente, como es el caso del Ni y el Cr en la medida del Fe.
- Control de los parámetros de la medida como el tiempo muerto del detector o la discriminación de masas.
- Exhaustivo control de blancos, ya que cualquier tipo de contaminación es una fuente de error.

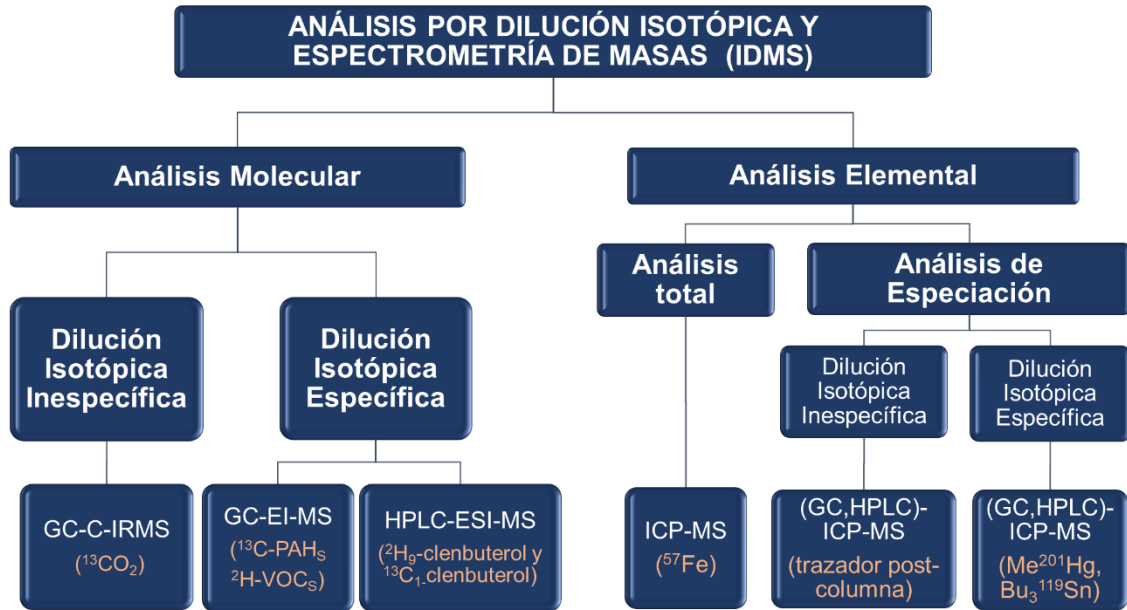


Figura A.33. Clasificación de las diferentes modalidades de IDMS según la especie a determinar.

La dilución isotópica puede clasificarse según la naturaleza de la especie que se va a medir mediante espectrometría de masas, en elemental o molecular (Figura A.33). La aplicación de IDA en el análisis elemental requiere el uso de fuentes de ionización elementales como la ionización Térmica (TI) o la fuente de plasma de acoplamiento inductivo. En el caso de la dilución isotópica molecular el objetivo no es el elemento, sino la especie química que contiene a ese elemento. En ocasiones la medida también se centra en un heteroátomo de una macromolécula orgánica (proteínas, ADN...), aunque el analito sea la molécula. En este caso el campo de estudio se conoce como metalómica.

Dentro de esta clasificación, la dilución isotópica puede llevarse a cabo con el objetivo de cuantificar las distintas especies químicas que contienen un elemento marcado (Especiación), o el contenido total de dicho elemento en la muestra. En estos casos, se recurre a técnicas híbridas basadas en el acoplamiento de una técnica de separación como la Cromatografía de Gases (GC) o la Cromatografía de Líquidos a espectrómetros de masas. El análisis por dilución isotópica molecular emplea principalmente fuentes de ionización moleculares, Electrospray (ESI) o ionización Electrónica (EI), acopladas principalmente a la cromatografía de líquidos (HPLC-ESI-MS) y de gases (GC-EI-MS). La dilución isotópica elemental para determinar el contenido total de un elemento en una muestra se puede considerar independiente del marcaje, ya que podemos

considerar que la fuente de ICP-MS, al ser una fuente dura, ioniza por igual a las diferentes especies. Aunque esto no es totalmente cierto en todos los casos, por tanto, siempre es preferible usar el marcaje específico de la especie. Un ejemplo sería la cuantificación del Fe total en una muestra, empleando un patrón enriquecido de ^{57}Fe . En cambio, en el análisis de especiación elemental encontramos dos modalidades: específica de la especie o inespecífica. En la dilución isotópica de especiación inespecífica el trazador es genérico del elemento a medir, y puede emplearse para varias especies. Este tipo de análisis se lleva a cabo empleando un trazador post-columna una vez que las especies se han separado. El modo de marcaje mediante dilución isotópica inespecífica post-columna se emplea cuando o bien no se conoce la estructura del compuesto a determinar, o no existe análogo enriquecido isotópicamente. Este modo de marcaje no cumple todas las ventajas de la dilución isotópica, por ejemplo, no permite corregir las pérdidas que se produzcan hasta que se produzca la unión post-columna. En la modalidad específica, se emplea como trazador la propia especie a determinar con una composición isotópica enriquecida, diferente de la natural. Por tanto, la dilución isotópica específica requiere de un trazador independiente para cada especie que se va a determinar, y que bien puede tener unas abundancias isotópicas comunes para todas las especies o estar enriquecido en un isótopo diferente para cada especie. En ese caso se habla de dilución isotópica múltiple específica de la especie.

A.4.3. Ecuación clásica de la dilución isotópica

Las primeras ecuaciones para el análisis por dilución isotópica elemental se pueden encontrar en un libro titulado: "*Electromagnetically enriched isotopes and Mass Spectrometry*"⁸¹ que recoge las contribuciones de un congreso celebrado en el "*Atomic Energy Research Establishment*" de Harwell (Reino Unido) en 1956.¹⁹⁵ En él, se presentan dos alternativas de cálculo basadas en la utilización de abundancias isotópicas o bien de relaciones isotópicas que fueron descritas por R. T. Jamieson y H. Hintenberger, respectivamente. Actualmente, estas ecuaciones se siguen utilizando ya que permiten obtener directamente y de forma absoluta la concentración inicial de un elemento natural en la muestra. El desarrollo de la ecuación propuesta por Hinterberger comienza considerando el número de moles de un elemento *poli*-isotópico

presente en la muestra (N_s) y el número de moles del mismo elemento en el trazador (N_t) añadido a la muestra.¹⁹⁶ Por tanto, el número total de moles del elemento en la mezcla resultante (N_m) será:

$$N_m = N_s + N_t \quad \text{Ec. A.4}$$

Se pueden plantear balances de masa similares para todas las composiciones isotópicas del compuesto. Para un elemento que no sea monoisotópico, para cada isótopo de masa nominal i tendremos:

$$N_m^i = N_s^i + N_t^i \quad \text{Ec. A.5}$$

Si introducimos en la ecuación las abundancias isotópicas, obtenemos la siguiente expresión para el balance de masas de cada isótopo con masa nominal i :

$$N_m \cdot A_m^i = N_s \cdot A_s^i + N_t \cdot A_t^i \quad \text{Ec. A.6}$$

donde A_m^i representa la abundancia relativa, medida experimentalmente, del compuesto para el isótopo i en la mezcla; A_s^i es la abundancia teórica relativa del compuesto natural a la misma masa nominal i ; y A_t^i es la abundancia teórica relativa del compuesto isotópicamente enriquecido también a la masa nominal i . Si consideramos un elemento que únicamente tiene dos isótopos a y b , las expresiones sería de la siguiente forma:

$$N_m \cdot A_m^a = N_s \cdot A_s^a + N_t \cdot A_t^a \quad \text{Ec. A.7}$$

$$N_m \cdot A_m^b = N_s \cdot A_s^b + N_t \cdot A_t^b \quad \text{Ec. A.8}$$

Dividiendo una ecuación entre la otra, se elimina el término N_m , y además podemos sustituir $R_m = A_m^a/A_m^b$ (Ec. A.9), de forma que la ecuación se reescribe como:

$$R_m = \frac{N_s \cdot A_s^a + N_t \cdot A_t^a}{N_s \cdot A_s^b + N_t \cdot A_t^b} \quad \text{Ec. A.10}$$

Reagrupando la ecuación A.10 de acuerdo a $R_{nat} = A_s^b/A_s^a$ (Ec. A.11) y $R_t = A_t^a/A_t^b$ (Ec. A.12) se obtiene:

$$N_s = N_t \cdot \frac{R_m \cdot A_t^b - A_t^a}{A_s^a + R_m \cdot A_s^b} \quad \text{Ec. A.13}$$

Esta ecuación puede reescribirse multiplicando y dividiendo por A_{enr}^b y A_{nat}^a :

$$N_s = N_t \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad \text{Ec. A.14}$$

En la ecuación A.14, todos valores del segundo término son conocidos o pueden determinarse experimentalmente, lo que permite conocer el número de moles de analito en la muestra. Si se añaden los valores de pesos atómicos a la ecuación y las masas obtenidas gravimétricamente de muestra y trazador (m_s y m_t), se puede transformar la ecuación en términos de concentración de la siguiente forma:

$$C_s = C_{enr} \cdot \frac{m_t}{m_s} \cdot \frac{W_s}{W_t} \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left(\frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad \text{Ec. A.15}$$

donde R_m , R_s y R_t son las relaciones isotópicas entre los isótopos a y b, en la mezcla, en la muestra y en el trazador respectivamente; C_s y C_t corresponden a la concentración de analito en la muestra y en la disolución enriquecida; y W_s y W_t son los pesos atómicos del elemento en la disolución de abundancia natural y en la disolución de trazador respectivamente. En la Figura A.34 se ilustra el proceso de dilución isotópica a través de las abundancias isotópicas para una

mezcla entre muestra con abundancias naturales y trazador con abundancias isotópicas enriquecidas para un elemento con dos isótopos a y b. En la ecuación no hay ningún parámetro relacionado con la sensibilidad instrumental, por tanto, ni la deriva en la señal ni efectos de matriz influyen en el resultado final. Se asume que la relación isotópica R_m se mantendrá constante. La incertidumbre en la medida queda restringida a las medidas de R_s , R_t y R_m ya que los pesos atómicos se encuentran tabulados (M_s y M_t) y las masas de muestra y trazador pueden determinarse gravimétricamente.

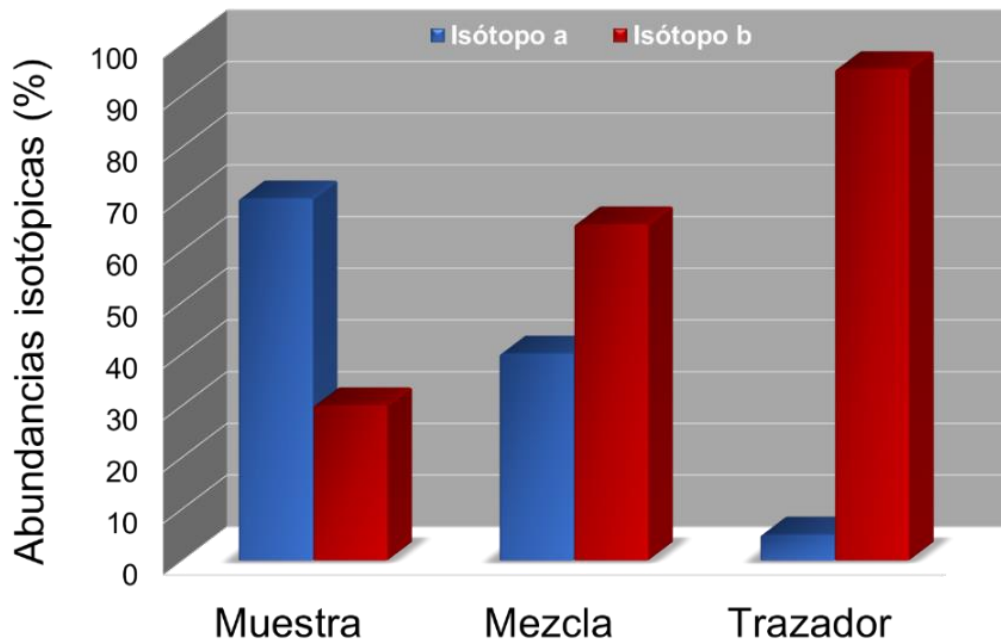


Figura A.34. Perfil isotópico de una mezcla de muestra y trazador con dos isótopos (a y b).

La relación isotópica en la muestra corresponde con la relación entre las abundancias teóricas de los isótopos. La caracterización de la disolución de trazador permite determinar las abundancias mediante la relación de intensidades entre los isótopos, y la concentración mediante el empleo de un patrón de concentración conocida y diferente composición isotópica (normalmente de abundancia natural). Y la relación isotópica en la mezcla se determina experimentalmente mediante espectrometría de masas. La medida obtenida es directamente trazable al sistema internacional.

A.4.4. Deconvolución de perfiles isotópicos

La deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) es una herramienta matemática que permite extraer la contribución de un compuesto en una mezcla, a través de los patrones isotópicos individuales de los componentes en dicha muestra. Por tanto, se trata de una herramienta matemática que consiste en considerar el perfil isotópico de una mezcla como una combinación lineal de los diferentes perfiles isotópicos que la constituyen. El cálculo se realiza a través de regresión lineal múltiple y da como resultado las fracciones molares de cada uno de los perfiles isotópicos de la mezcla. Este procedimiento, llevado a cabo por IPD se ilustra en la Figura A.35, para una mezcla de dos perfiles isotópicos.

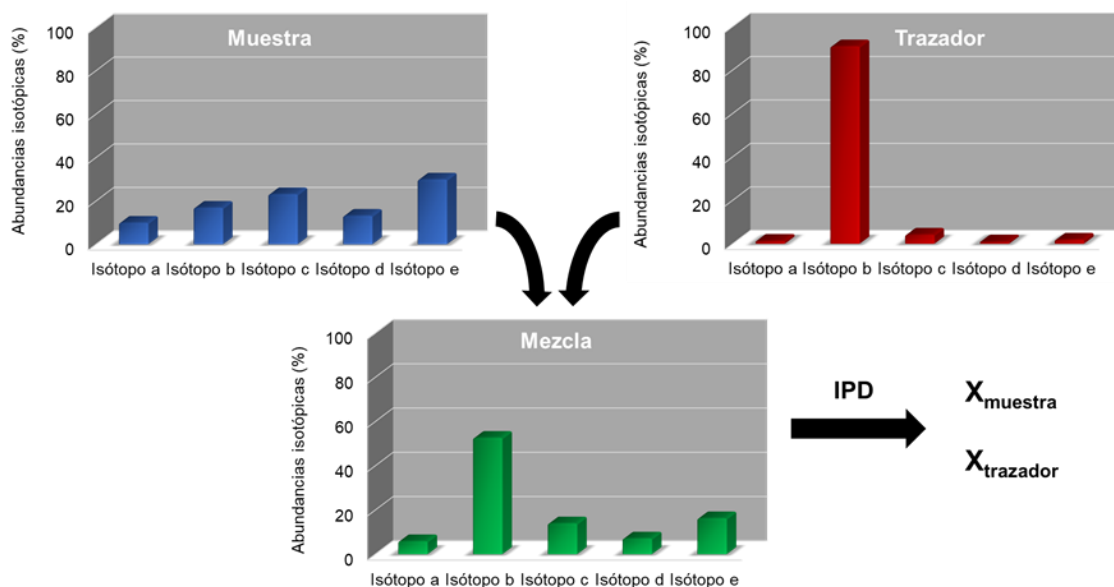


Figura A.35. Ilustración del concepto de IPD para una mezcla de un analito y un trazador isotópico.

Por un lado, tenemos como analito en la muestra un elemento con 5 isótopos (a-e) y por el otro un trazador enriquecido en el isótopo b. En este caso se obtienen mediante IPD las fracciones molares de la mezcla resultante entre ambos. Partiendo del balance de masas de la Ec. A.6, dividiendo ambos términos entre N_m , y sustituyendo las expresiones para las fracciones molares de analito $X_s = N_s^i/N_m$ (Ec. A.16) y trazador $X_t = N_t^i/N_m$ (Ec. A.17) se obtiene la siguiente expresión:

$$A_m^i = x_s \cdot A_s^i + x_t \cdot A_t^i \quad \text{Ec. A.18}$$

Esta expresión indica que las abundancias isotópicas medidas en la mezcla se pueden expresar como una combinación lineal de las abundancias isotópicas naturales de la muestra y las enriquecidas del trazador, siendo las fracciones molares los coeficientes. Para un elemento con n isótopos esta ecuación puede expresarse en forma matricial de la siguiente manera:

$$\begin{bmatrix} A_m^i \\ A_m^{i+1} \\ \dots \\ A_m^{n-1} \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_s^i & A_t^i \\ A_s^{i+1} & A_t^{i+1} \\ \dots & \dots \\ A_s^{n-1} & A_t^{n-1} \\ A_s^n & A_t^n \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_s \\ x_t \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^i \\ e^{i+1} \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad \text{Ec. A.19}$$

En la matriz representada en la ecuación A.19, las abundancias isotópicas naturales de los elementos son conocidas ya que están tabuladas,¹⁹⁷ y las experimentales se obtienen a través de las áreas de pico medidas para cada masa isotópica. El término e hace referencia a un vector que representa el error asociado a la ecuación. El resultado puede obtenerse mediante regresión lineal múltiple ya que tenemos más ecuaciones que incógnitas. El número de ecuaciones lo determina el número de masas medidas mientras que el número de incógnitas lo define las distintas composiciones isotópicas de las que puede venir la mezcla. En un experimento típico de dilución isotópica las únicas incógnitas del sistema de ecuaciones son las fracciones molares x_s y x_t .¹⁵¹

Una de las primeras aplicaciones de este procedimiento de cálculo, fue la determinación de interferencias isobáricas.¹⁹⁸ Posteriormente se empleó la IPD para el estudio de la interconversión entre especies,^{199,200} los procesos metabólicos,^{201,202} o la corrección de la discriminación de masas sin empleo de un estándar externo.²⁰³

A.4.5. Análisis por dilución isotópica específica de especies con múltiples trazadores enriquecidos

El análisis por dilución isotópica específica de varias especies puede llevarse a cabo añadiendo, todas las especies enriquecidas en un mismo isótopo (dilución isotópica sencilla), o en diferentes isótopos del elemento (dilución isotópica con trazadores múltiples). La dilución isotópica sencilla permite corregir las pérdidas de analito que se producen durante la etapa de análisis, una vez que se mezclan muestra y trazador. Sin embargo, esas pérdidas únicamente pueden ser corregidas cuando no generan una cantidad adicional de ninguno de los analitos. En otras palabras, la dilución isotópica sencilla no permite corregir interconversiones entre los analitos. Para este propósito es necesario el empleo de trazadores múltiples que consisten en que cada una de las especies involucradas, está enriquecida en un isótopo diferente del elemento. El primer trabajo de este tipo fue presentado por Hintelmann y Evans²⁰⁴, para la especiación de MeHg y Hg(II). Otros trabajos que siguieron a este, demostraron que la metodología podía utilizarse tanto para una cuantificación exacta corrigiendo las interconversiones a través de las etapas analíticas como para seguir procesos de transformación y degradación de especies.²⁰⁵⁻²⁰⁹ El principio en el que se basa este tipo de procedimiento es un sistema cerrado, en el que existen dos compuestos A y B que pueden transformarse entre sí, según se ilustra en la Figura A.36.

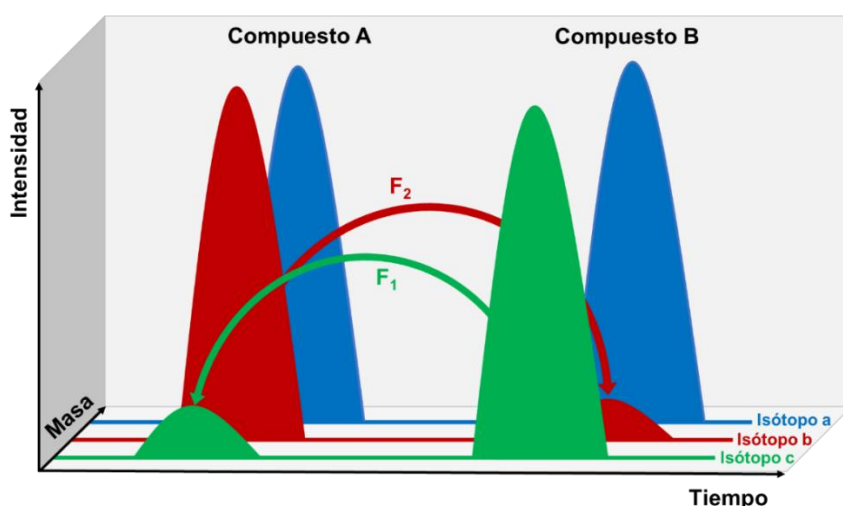


Figura A.36. Cromatograma obtenido en IDMS de especiación con doble trazador para corregir las transformaciones F1 y F2 entre los compuestos A y B.

Estos compuestos, pueden presentarse al menos en tres formas isotópicas diferentes. En el caso del análisis elemental, el analito presentará al menos tres isótopos diferentes (a, b y c). El isótopo a presentará la abundancia más alta para ambas especies en su estado natural. El trazador para el compuesto A estará enriquecido en el isótopo b y el trazador para el compuesto B estará enriquecido en el isótopo c. Por tanto, a la muestra se añadirán ambos trazadores correspondientes a cada una de las especies enriquecidas en un isótopo diferente. De forma que tendremos un balance de masas para cada especie en la mezcla de la siguiente forma:

$$N_m^A = N_s^A + N_{tA}^A + N_{tB}^A \quad \text{Ec. A.20}$$

$$N_m^B = N_s^B + N_{tB}^B + N_{tA}^B \quad \text{Ec. A.21}$$

Donde N_{tA}^A y N_{tB}^B son el número de moles añadidos del trazador de cada especie, mientras que N_{tB}^A y N_{tA}^B son las impurezas de la especie A en el trazador B y de la especie B en el trazador A, respectivamente. La determinación de las concentraciones, las abundancias isotópicas y las impurezas de cada trazador deben conocerse previamente, bien mediante un procedimiento experimental o por un certificado de análisis proporcionado por el fabricante del trazador. En esta mezcla, una vez que se alcanza el equilibrio isotópico, pueden darse procesos de transformación entre especies como se muestra en la Figura A.36. Estas transformaciones pueden ser fruto de las condiciones experimentales o de los diferentes procesos por los que atraviesan los analitos durante la preparación de las muestras. De este modo un factor de transformación F1 (%) del compuesto B se transforma en el compuesto A, lo que se refleja en la conversión del trazador a través del isótopo enriquecido c. Del mismo modo el compuesto A se transforma en B en un factor de transformación F2 (%), que se refleja en el trazador a través del isótopo enriquecido b. Por tanto, el número de moles de cada especie serán los que se han transformado en la otra especie, según el porcentaje dado por el factor de transformación correspondiente, menos el número de moles que se han transformado desde la otra especie. De este modo los balances de masas pueden reescribirse de la siguiente forma:

$$N_m^A = (N_{nat}^A + N_{tA}^A + N_{tB}^A) \times (1 - F2) + (N_{nat}^B + N_{tA}^B + N_{tB}^B) \times F1 \quad \text{Ec. A.22}$$

$$N_m^B = (N_{nat}^B + N_{tB}^B + N_{tA}^B) \times (1 - F1) + (N_{nat}^A + N_{tA}^A + N_{tB}^A) \times F2 \quad \text{Ec. A.23}$$

Para la resolución de estos balances de masas y la obtención del número de moles de cada especie en la muestra inicial (N_S^A y N_S^B) se han desarrollado varios modelos matemáticos^{204,205,210,211}. Uno de ellos es el cálculo mediante IPD, que permite escribir estas ecuaciones mediante una serie de ecuaciones matriciales dónde se obtienen como solución tanto el número de moles de las especies en la muestra, como los factores de transformación entre los analitos. Este tipo de análisis, a pesar de sus amplias prestaciones, tiene una serie de restricciones y limitaciones. En primer lugar, es necesario tener perfectamente caracterizados los trazadores, tanto en composición isotópica como en impurezas. Además, debe alcanzarse el equilibrio isotópico antes de que se produzca cualquier transformación o pérdida de los analitos. La principal limitación de la técnica se observa cuando las concentraciones de las especies son muy diferentes en la muestra, ya que esto provoca que las incertidumbres en el cálculo también sean elevadas.²¹² Entre las aplicaciones de la dilución isotópica con trazadores múltiples encontramos estudios de metabolismo, cuantificación, estudios *in vivo*, y en general cuantificaciones de entre especies que experimentan procesos redox o de trans-alkilaciones.

A.5. Variaciones naturales de la composición isotópica de los elementos

Los isótopos fueron descubiertos por J.J. Thomson en 1913, cuando analizaba el espectro del Ne a la masa 20, observando una ligera línea a la masa 22.²¹³ Los isótopos son átomos de un elemento, que comparten el número de protones en el núcleo, pero difieren en el número de neutrones. En la naturaleza, la mayoría de los elementos tienen al menos dos isótopos estables, aunque algunos son monoisotópicos como es el caso del Au. El origen de los isótopos se remonta a 4600 millones de años, por procesos nucleares generados en las estrellas.²¹⁴ Pueden ser estables o radioactivos según se descompongan emitiendo radiación o permanezcan "invariables". Se dice que los isótopos son "estables" cuando no tienden a desintegrarse, es decir, sus abundancias en la naturaleza se mantienen invariables. Pero incluso cuando los isótopos son estables, se producen pequeñas variaciones en su composición elemental natural, que se identifican como pequeñas desviaciones en las relaciones isotópicas. Este fenómeno es conocido como fraccionamiento isotópico y se produce como consecuencia de un comportamiento diferente de los isótopos de un mismo elemento durante un proceso biogeoquímico.

A.5.1. Fraccionamiento isotópico de isótopos estables.

Se define como fraccionamiento isotópico a la variación de la abundancia relativa de los isótopos estables de un elemento, debida a un proceso físico, químico o biológico. El fraccionamiento isotópico depende de diversos factores, como las diferencias de masa relativa entre los isótopos, la naturaleza del enlace o el estado de oxidación. Las variaciones naturales en la composición isotópica de elementos ligeros han sido ampliamente estudiadas gracias a la espectrometría de masas de relaciones isotópicas (IRMS) para elementos ligeros como el O, H, N y C.²¹⁵ No obstante, en las últimas décadas, la excelente precisión que ofrecen los equipos MC-ICP-MS, combinada con la posibilidad de medir en condiciones libres de interferencias, ha permitido estudiar, por ejemplo, variaciones isotópicas de elementos más pesados y menos

tradicionales como el Hg o Sn. El fraccionamiento isotópico es mucho más pronunciado para los elementos ligeros, donde la diferencia de masa relativa ($\Delta m/\bar{m}$) entre los isótopos es mayor en comparación con los elementos pesados. Esto hizo que los primeros trabajos sobre fraccionamiento isotópico fueran desarrollados para elementos como el hidrógeno (H), el carbono (C), el oxígeno (O), el nitrógeno (N) y el azufre (S).²¹⁶ Un requisito importante para llevar a cabo estos estudios, es que la técnica empleada ofrezca una elevada precisión y exactitud, pues las diferencias observadas en las relaciones isotópicas son a menudo muy pequeñas.

Las variaciones isotópicas naturales son muy pequeñas y las diferencias deben expresarse como desviaciones respecto a un estándar en notación delta (δ) y tanto por mil (‰). Debido a las pequeñas variaciones que se producen en las relaciones isotópicas absolutas, debidas al fraccionamiento isotópico, las relaciones isotópicas se expresan como relaciones isotópicas relativas. Para ello se calcula la diferencia entre la relación isotópica absoluta y la de un estándar de referencia medido antes y después de la muestra.

$$\delta^{xxx} = \frac{R_{muestra} - R_{referencia}}{R_{ref}} \times 1000 \text{ ‰} \quad \text{Ec. A.24}$$

A.5.2. Fraccionamiento isotópico del C

El carbono es uno de los elementos más estudiados en cuanto a su composición, a través de las medidas $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. El fraccionamiento isotópico durante la transferencia geoquímica de C en la naturaleza produce variaciones en la distribución de equilibrio de los isótopos de carbono (^{12}C , ^{13}C y ^{14}C). Craig (1953)²¹⁷ fue el primero en identificar por primera vez que ciertos procesos bioquímicos alteran el equilibrio entre los isótopos de carbono. Algunos procesos, como la fotosíntesis, favorecen un isótopo sobre el otro. El valor $\delta^{13}\text{C}$ de una muestra puede aportar información importante sobre el entorno de donde procede o sobre las mezclas de materiales utilizados en su producción ya que el valor isotópico de la muestra refleja la composición isotópica del entorno inmediato.

El C tiene dos isótopos estables el ^{12}C con una abundancia de 98.93% y el ^{13}C 1.07%. Las variaciones naturales de la composición isotópica de C llegan hasta el 120‰ (+20‰ carbonatos pesados y menores de -100‰ en metano).²¹⁸ Se determinan mediante la medida de la relación 45/44 del CO_2 ($^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2/^{13}\text{C}^{16}\text{O}_2$) producido por combustión en el propio sistema, y se expresan respecto a la relación isotópica del estándar *Pee Dee Belemnite*, en notación delta (δ). El fraccionamiento isotópico de ^{13}C respecto al ^{12}C es originado por diversos procesos biogeoquímicos. El carbono se encuentra en una amplia variedad de compuestos en la Tierra, desde compuestos orgánicos en la biosfera a compuestos inorgánicos oxidados como CO_2 y carbonatos. Algunos de los valores de $\delta^{13}\text{C}$, se muestran en la Figura A.37. Esto permite que los valores de $\delta^{13}\text{C}$ se empleen en multitud de campos como en estudios arqueológicos, trazadores en procesos biogeoquímicos, en estudios biológicos, trabajos de marcaje *in vivo*, etc.

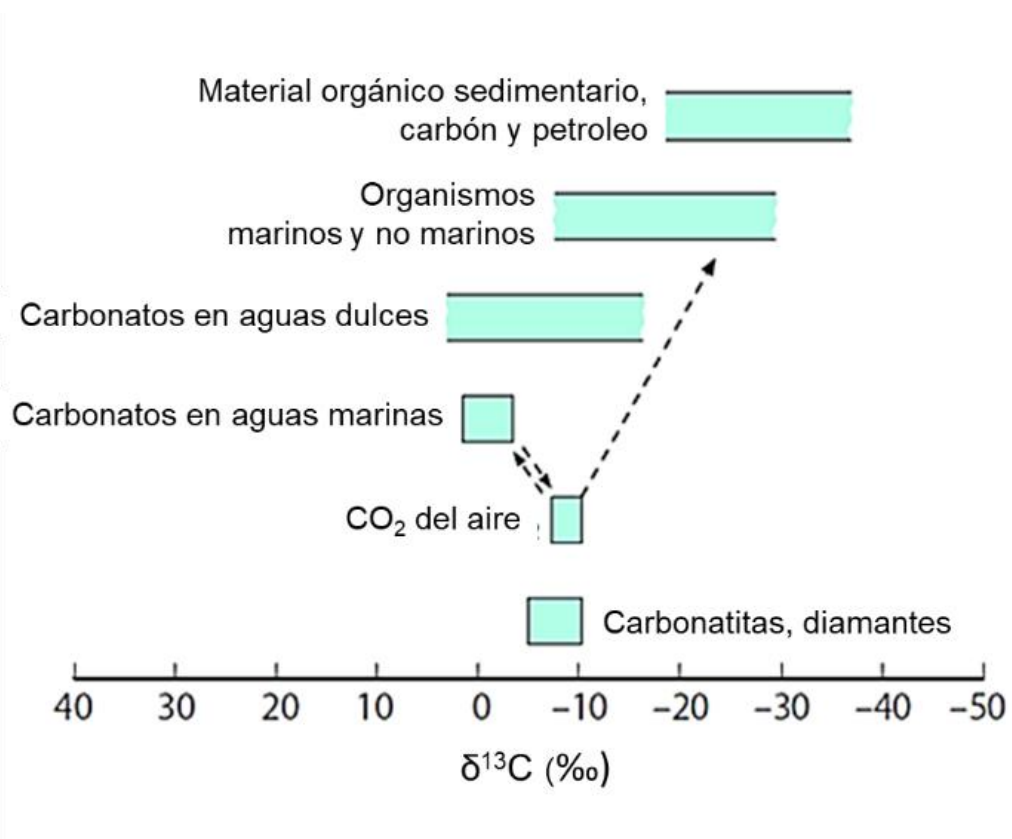


Figura A.37. Valores de $\delta^{13}\text{C}$ en diferentes reservorios geológicos, extraído de Hoefs.²¹⁸

A.5.2. Fraccionamiento isotópico dependiente de la masa

Los estudios de fraccionamiento isotópico en elementos pesados han estado ligados al desarrollo tecnológico que permitiese la medida de pequeñas variaciones isotópicas con alta precisión. El empleo de estos elementos pesados es muy útil en estudios de procedencia y en datación geocronológica. La influencia de las variaciones isotópicas por procesos de origen antropogénico permite emplear estos elementos en estudios de trazabilidad. Este tipo de estudios tienen especial interés para los isótopos de Pb y Hg, ya que ambos están ligados a las emisiones de combustibles fósiles.

El fraccionamiento isotópico dependiente de la masa (MDF, por sus siglas en inglés), puede darse tanto en procesos físicos como en reacciones químicas, de forma que permite obtener información acerca del transcurso de dichos procesos. El MDF es un fenómeno enmarcado dentro de la mecánica cuántica dominado por las energías vibracionales involucradas en una transformación.²¹⁹ Este efecto produce un enriquecimiento de los productos de una transformación física o una reacción química en los isótopos más ligeros. Las leyes por las que se rigen estas transformaciones varían según se produzca la reacción. Los procesos químicos, físicos y biológicos se pueden clasificar como reacciones de equilibrio reversibles o reacciones cinéticas unidireccionales irreversibles.

En reacciones químicas el MDF se produce por efectos que presentan una relación lineal entre el grado de fraccionamiento y la diferencia de masa entre isótopos. El grado de fraccionamiento isotópico (α) se fundamenta en la partición de los isótopos 1 y 2 (siendo 2 el más abundante), entre las especies precursora (a) y producto (b). El grado de fraccionamiento entre a y b viene dado por:

$$\alpha^{a-b} = \frac{\left(\frac{N_2}{N_1}\right)_a}{\left(\frac{N_2}{N_1}\right)_b} = \frac{\left(\frac{n_2}{n_1}\right)_a}{\left(\frac{n_2}{n_1}\right)_b} \quad \text{Ec. A.25.}$$

donde N es el número de núcleos y n es el número de moles de los isótopos 1 y 2 entre las especies a y b.²²⁰ Este grado de fraccionamiento depende de la ley que rige el proceso

fisicoquímico. Si se alcanza un equilibrio, el fraccionamiento está controlado por leyes termodinámicas. Si en cambio se da una reacción irreversible y unidireccional son las leyes cinéticas las que controlan el fraccionamiento. En las transformaciones físicas que presentan MDF, también podemos encontrar modelos de distribución de Rayleigh, en lugar de lineales. En un sistema de tres isótopos se puede definir un nuevo término, el factor de fraccionamiento (β), de modo que la distribución de esos tres isótopos entre las especies a y b se puede reescribir de la siguiente forma:

$$\alpha_{3/1}^{a-b} = (\alpha_{2/1}^{a-b})^{\beta} \quad \text{Ec. A.26.}$$

$$\ln \alpha_{3/1}^{a-b} = \beta \cdot \ln \alpha_{2/1}^{a-b} \quad \text{Ec. A.27.}$$

El factor β dependerá del mecanismo por el cual se produce el fraccionamiento isotópico entre las dos especies: distribuciones lineales de origen termodinámico o cinético, o una distribución de Rayleigh.

El fraccionamiento isotópico sigue una distribución de Rayleigh en algunos procesos físicos de sistemas que cumplen unas ciertas características.²¹⁹ La ley describe la partición de un isótopo entre dos reservorios a medida que uno va disminuyendo y el otro aumentando en un proceso unidireccional.²²¹ Un ejemplo de esta transformación sería la evaporación de agua en un sistema cerrado, de forma que es irreversible. La energía necesaria para evaporar los isótopos ligeros de oxígeno (^{16}O) es menor que la requerida para los pesados (^{18}O). Sin embargo, a medida que el líquido se enriquece en los pesados, el proceso inicial se modifica, ya que requiere una mayor energía, siendo el modelo de fraccionamiento en este caso una distribución de Rayleigh. Para dicha distribución podemos escribir el fraccionamiento isotópico de la siguiente forma:

$$\alpha_t = \frac{R_t}{R_0} \quad \text{Ec. A.28.}$$

$$R_t = R_0 \cdot \alpha_t^{(\beta-1)} \quad \text{Ec. A.29.}$$

donde R_t relación isotópica del elemento en la fase líquida en el instante t , R_0 la relación isotópica del elemento en el instante inicial $t=0$, α es el grado de fraccionamiento isotópico y β es el factor de fraccionamiento isotópico.

El fraccionamiento de origen termodinámico o de equilibrio se produce en el intercambio de los isótopos entre dos especies en equilibrio. Este proceso está controlado por las leyes de la termodinámica, donde las diferencias en ΔG entre los isótopos ligeros y pesados determinan el grado de fraccionamiento. De acuerdo al diagrama de energías vibracionales en una molécula (Figura A.38), los átomos ligeros forman enlaces más débiles que los pesados. Como regla general, los enlaces entre los isótopos más ligeros se rompen más fácilmente que los enlaces equivalentes de isótopos más pesados por poseer menores Energías de disociación (E_D). Por lo tanto, los isótopos ligeros reaccionan más rápido y se concentran en los productos, haciendo que los reactivos residuales se enriquezcan en los isótopos pesados.

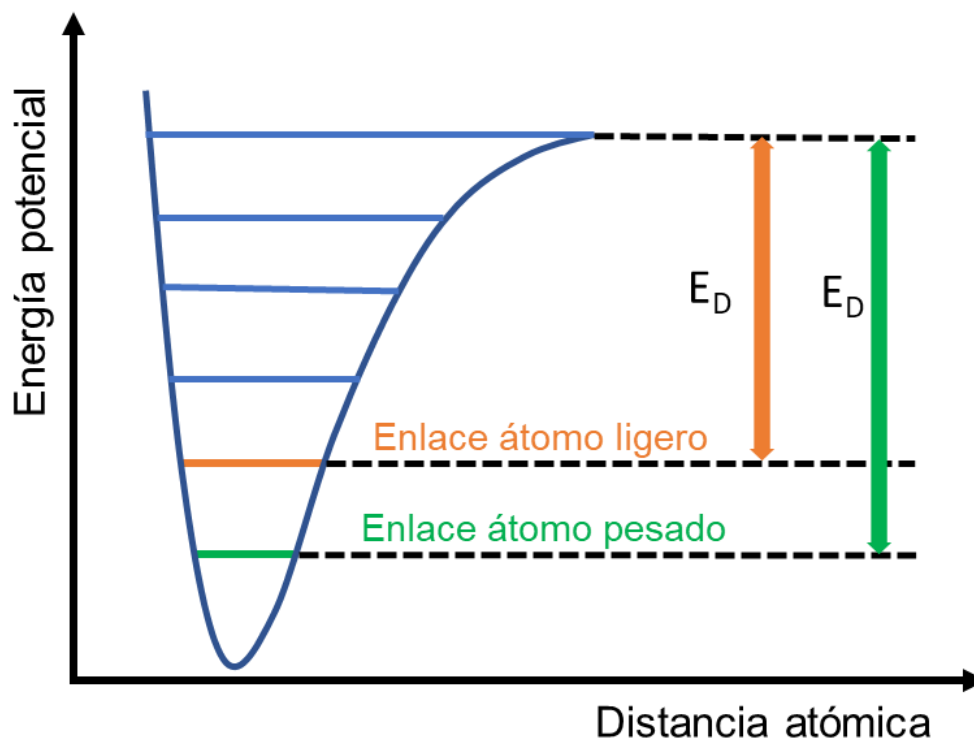


Figura A.38. Diagrama de energías vibracionales de una molécula.

Urey y Bigeleisen fueron los primeros en definir el fraccionamiento de origen termodinámico.^{222,223} Establecieron una relación entre el grado de fraccionamiento y la diferencia de energía de formación en el caso de un gas ideal de la siguiente forma:

$$\alpha = 1 + \frac{1}{24} \cdot \left(\frac{h}{k_b \cdot T}\right)^2 \cdot \left(\frac{1}{m_1} - \frac{1}{m_2}\right) \cdot \sum_j \left(\frac{K_{\alpha,j}}{4\pi^2}\right) \quad \text{Ec. A.30.}$$

Esta ecuación fue utilizada por Young, Galy and Naharra para un sistema de tres o más isótopos²²⁴. Al combinar la ecuación A.32 con la ecuación de A.29, obtenemos el valor de β en el caso de un sistema de tres isótopos en equilibrio:

$$\beta_{equilibrio} = \frac{\left(\frac{1}{m_1} - \frac{1}{m_2}\right)}{\left(\frac{1}{m_1} - \frac{1}{m_3}\right)} \quad \text{Ec. A.31.}$$

De acuerdo a esta ecuación, el fraccionamiento de origen termodinámico entre dos isótopos 1 y 2, puede expresarse en función de las masas atómicas (m_1 y m_2). El fraccionamiento cinético se debe a las diferentes velocidades de reacción que existen entre moléculas.²²⁵ En sistemas sin equilibrio, las velocidades de reacción hacia productos o reactivos no son idénticas. Esto conlleva que las reacciones isotópicas pueden ser unidireccionales, si los productos de reacción se aíslan físicamente de los reactivos. La magnitud del fraccionamiento isotópico cinético es función de las energías cinéticas ($Ec = 1/2 mv^2$) de los isótopos. Si se considera el fraccionamiento isotópico α en función de las velocidades de transformación:

$$\alpha_{2/1}^{a-b} = \frac{v_2}{v_1} \quad \text{Ec. A.32.}$$

$$\alpha_{3/1}^{a-b} = \frac{v_3}{v_1} \quad \text{Ec. A.33.}$$

Al combinar ambas ecuaciones se obtiene el factor de fraccionamiento de origen cinético.²¹⁹

$$\beta_{\text{cinético}} = \frac{\ln\left(\frac{v_2}{v_1}\right)}{\ln\left(\frac{v_3}{v_1}\right)} = \frac{\ln\left(\frac{m_1}{m_2}\right)}{\ln\left(\frac{m_1}{m_3}\right)} \quad \text{Ec. A.34.}$$

donde m_{1-3} serán las masas nominales para cada uno de los isótopos y v_{1-3} las velocidades de reacción de los isótopos. Se ha determinado efecto cinético en diversos procesos fisicoquímicos y biológicos. El factor de fraccionamiento isotópico (β) permite diferenciar el mecanismo por el cual se produce la transformación a nivel isotópico entre dos especies. A la hora de evaluar el MDF, puede realizarse una curva de tres isótopos (como se detallará en la sección A.5.4). El valor de la pendiente de la regresión lineal será el valor de β , y permitirá obtener información sobre el mecanismo de MDF. Para diferenciar entre ambos procesos se requiere una alta precisión, y normalmente el valor resultante no permite diferenciarlos. Lo normal es que las transformaciones den lugar a una mezcla entre efectos cinéticos y termodinámicos.

El fraccionamiento total observado en un sistema, por efecto del balance de masa, es el resultado de la contribución de los diferentes procesos que provocan fraccionamiento isotópico:

$$\delta_{\text{sistema}} = \sum_{i=1} X_i \delta_i \quad \text{Ec. A.35}$$

A.5.3. Fraccionamiento isotópico independiente de la masa

La primera vez que se observaron anomalías respecto al comportamiento MDF fue en las relaciones isotópicas de O en meteoritos.²²⁶ Este efecto se explicó por un efecto causado por la síntesis nuclear en las estrellas. Años más tarde, se consideró la hipótesis de que se tratase de un efecto químico o fotoquímico.²²⁷ Este efecto en muestras terrestres está limitado sólo a algunos elementos como O, S, Cr, U, Zn, Hg etc.²¹⁹ Existen dos posibles mecanismos para explicar el fraccionamiento independiente de la masa (MIF). Por un lado el efecto de volumen nuclear (NVE) y por otro el efecto magnético isotópico (MIE), que afectan a los isótopos impares.^{228,229} Pero además se ha observado un MIF de los isótopos pares cuyo mecanismo es aún desconocido.

A.5.3.1. Efecto de volumen o campo nuclear

Jacob Bigeleisen fue el primero en explicar el efecto anómalo de fraccionamiento isotópico en la relación $^{238}\text{U}/^{235}\text{U}$ como una consecuencia del efecto de volumen o campo nuclear (NVE o NFS).^{230,231} Aunque los isótopos se diferencian en el número de neutrones, el volumen nuclear no aumenta proporcionalmente a esos electrones como se ilustra en la Figura A.39, para los isótopos de Hg.²²⁸

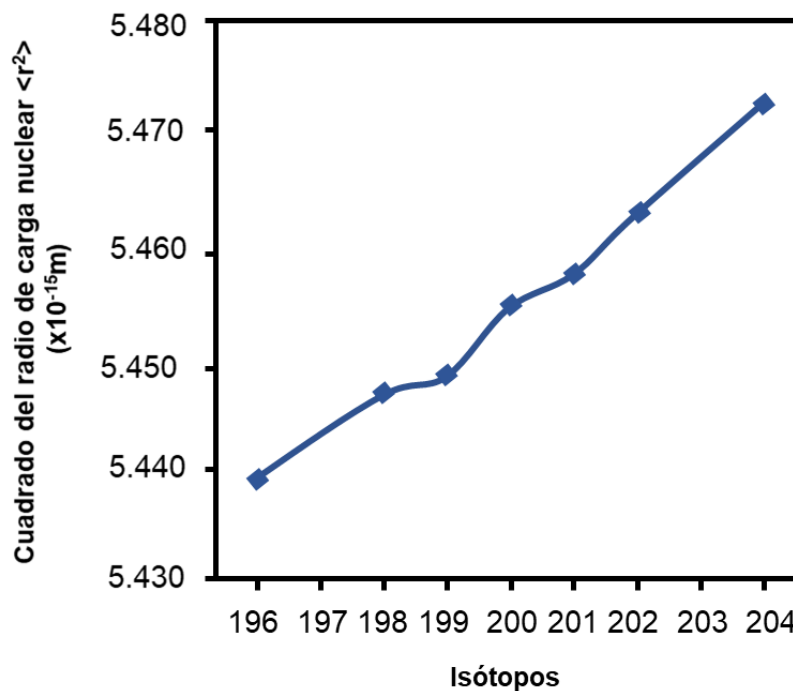


Figura A.39. Valor del $\langle r^2 \rangle^{1/2}$ para los isótopos de Hg adaptada de Schauble (2007).²²⁸

Los isótopos impares tienen los electrones de su banda de valencia más unidos al núcleo debido a un menor $\langle r^2 \rangle$ que los pares por lo que su densidad de carga es mayor. Estas diferencias en forma, tamaño nuclear y densidad de carga nuclear afectan a la interacción entre el núcleo y su entorno. Si todos los átomos se encuentran en la misma forma elemental, los impares formarán enlaces covalentes más débiles y se transferirán preferencialmente. Diferentes procesos fisicoquímicos han puesto en evidencia el fraccionamiento causado por NVE.²³² El factor de fraccionamiento isotópico (β) para NVE está relacionado con $\langle r^2 \rangle$ y se define por:

$$\beta_{NVE} = \frac{(\langle r_1^2 \rangle - \langle r_2^2 \rangle)}{(\langle r_1^2 \rangle - \langle r_3^2 \rangle)} \quad \text{Ec. A.36}$$

Los productos de la transformación experimentarán un enriquecimiento en los isótopos más ligeros pero como este enriquecimiento está limitado a los isótopos impares, no se sigue la misma tendencia lineal que se daría en un fraccionamiento dependiente de la masa.

A.5.3.2. Efecto magnético isotópico

El efecto magnético isotópico (MIE), como su nombre indica, está controlado por las interacciones magnéticas. Los isótopos impares se caracterizan por poseer un momento de espín nuclear distinto de cero. Esto puede dar lugar a una conversión triplete-singlete, que induce fraccionamiento isotópico.²²⁹ El MIE solo se da en reacciones cinéticas donde se forman pares radicales que son susceptibles de sufrir conversiones de espín. Uno de los procesos responsables de MIE es la fotoreducción, por exposición a la luz.^{232,233}

A.5.3.3. Efecto de auto-blindaje.

Aunque MIE y NVE se consideran los procesos más probables, también es posible que se produzca fraccionamiento independiente de la masa en los isótopos pares. Este efecto denominado de auto-blindaje (SSE por sus siglas en inglés) se observó por primera vez para los isótopos de O en condiciones de laboratorio y también se ha utilizado para explicar las anomalías de los isótopos en meteoritos.^{234–236} Otros ejemplos que presentan MIF con una magnitud ligeramente positiva, son muestras de precipitaciones, y también el Hg en lámparas fluorescentes.^{237,238} Una de las hipótesis es que este fenómeno se produce por una fotoexcitación preferencial de los isótopos menos abundantes.²³⁹ Sin embargo, aún no se conoce su origen en profundidad.

A.5.4. Variabilidad isotópica natural de Hg

El Hg tiene interés toxicológico debido al riesgo que supone para los seres vivos, pero también interés medioambiental, ya que permite trazar procesos biogeoquímicos. Las especies de mercurio coexisten en la naturaleza y son reactivas, con carácter redox y tendencia a formar enlaces covalentes. Debido a estas transformaciones el Hg experimenta fraccionamiento isotópico tanto dependiente como independiente de la masa.

A.5.4.1. Notación delta para estudios de fraccionamiento isotópico de Hg

El Hg posee siete isótopos estables con masa nominal de 196, 198, 199, 200, 201, 202 y 204 u. La diferencia relativa de masa de los isótopos de Hg es del 4%, con lo que en principio se espera que las variaciones naturales de su composición isotópica sean muy pequeñas. Las pequeñas variaciones en la composición isotópica pueden ser medidas como relaciones isotópicas relativas a un estándar y se expresan en notación delta y tanto por mil.²⁴⁰ De acuerdo a esto, el fraccionamiento del isótopo ^{xxx}Hg respecto al ¹⁹⁸Hg entre los estados a y b se expresa de la siguiente forma:

$$\alpha^{xxx} = \frac{\left(\frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}}\right)_a}{\left(\frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}}\right)_b} \quad \text{Ec. A.37.}$$

El uso de ¹⁹⁸Hg como denominador en los valores de $\delta^{xxx}\text{Hg}$ fue recomendado desde un principio para los isótopos de Hg²⁴⁰ y ha sido adoptado por casi todos los grupos de investigación.²⁴¹ Esta recomendación sigue las pautas del campo de geoquímica de isótopos estables que consiste en expresar el fraccionamiento isotópico utilizando relaciones isotópicas con el isótopo más ligero en el denominador, de modo que valores delta más altos siempre significan un enriquecimiento en el isótopo más pesado. En este caso no se emplea el isótopo más ligero del Hg (¹⁹⁶Hg) debido a que su abundancia natural es solamente del 0.15%. De este modo el $\delta^{202}\text{Hg}$, se expresaría según la ecuación A.38:

$$\delta^{202}Hg = \left(\frac{\left(\frac{^{202}Hg}{^{198}Hg} \right)_{muestra}}{\left(\frac{^{202}Hg}{^{198}Hg} \right)_{referencia}} - 1 \right) \times 1000 \text{ ‰} \quad \text{Ec. A.38}$$

Como estándar de referencia (estándar “delta cero”) se emplea el NIST 3133, de acuerdo a las recomendaciones propuestas por Blum y Bergquist para expresar las variaciones naturales de la composición isotópica del Hg.²⁴⁰ El fraccionamiento isotópico independiente (MIF) de la masa se detecta como una desviación de la línea de MDF, que se produce principalmente en los isótopos impares. La magnitud del MIF se cuantifica como $\Delta^{xxx}Hg$ a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta^{xxx}Hg = \delta^{xxx}Hg - (\delta^{202}Hg \times \beta_{xxx}) \quad \text{Ec. A.39}$$

donde β_{xxx} es el factor de fraccionamiento cinético, que es característico para cada masa isotópica, con valores de 0.2520, 0.5024 y 0.7520 para ¹⁹⁹Hg, ²⁰⁰Hg y ²⁰¹Hg, respectivamente.

A.5.4.1. Evaluación de la variabilidad isotópica de Hg

El estudio de la variabilidad natural en la composición isotópica del mercurio (Hg) comenzó hace casi dos décadas.^{242,243} Los avances tecnológicos en los espectrómetros de masas de tipo multicolector han hecho posible la determinación del fraccionamiento isotópico del Hg en muestras biológicas y medioambientales.^{244,245} La “huella isotópica” de Hg puede aportar información acerca de diferentes procesos fisicoquímicos o metabólicos por los que atraviesan las especies. Para ello los datos de composición isotópica deben ser evaluados a través de valores de deltas que puedan ser comparados con otros estudios. Una primera evaluación del fraccionamiento isotópico de Hg puede realizarse a través de los diagramas de tres isótopos, donde los datos pueden representarse de la forma: $\delta^{xxx/198}Hg$ frente a $\delta^{202/198}Hg$. En la Figura A.40 se muestran los diagramas de tres isótopos para los isótopos de Hg en diferentes

experimentos, extraídos de Bergquist y Blum (2007).²⁴⁶ En estos diagramas puede observarse como los isótopos pares siguen una línea recta correspondiente al MDF, mientras que los impares, que siguen procesos fotoquímicos, se desvían de dicha línea por efecto del MIF. Este tipo de diagramas se usan para analizar el fraccionamiento isotópico y son muy empleados en el campo de la geoquímica, ya que permiten distinguir entre mecanismos gobernados por MDF o MIF.

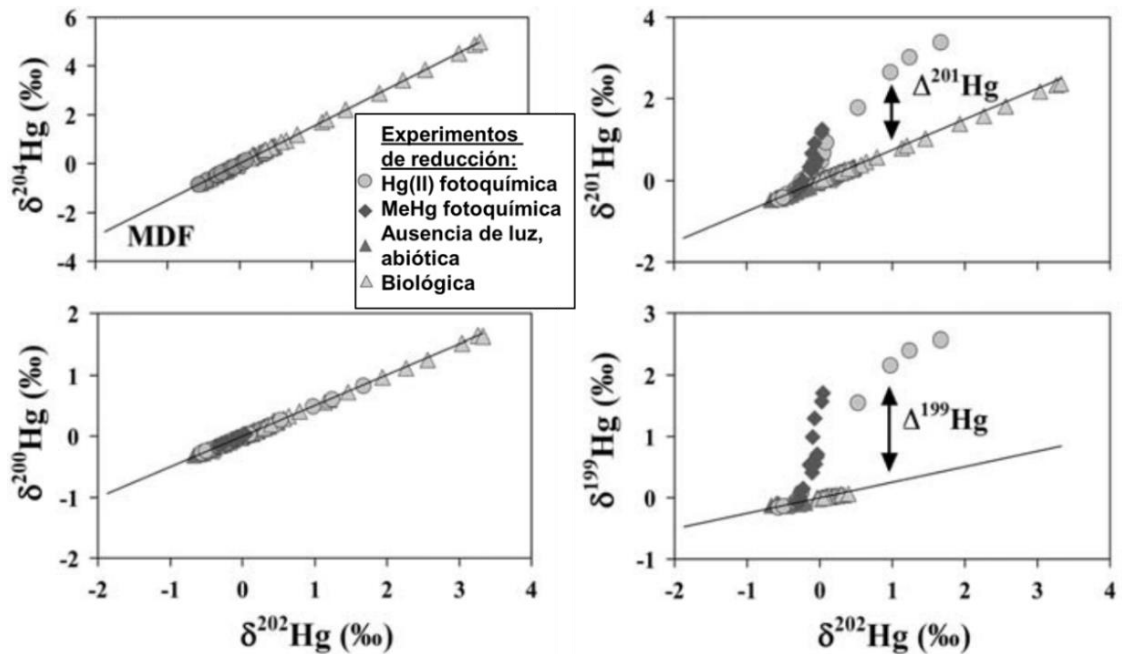


Figura A.40. Diagramas de tres isótopos para $\delta^{204/198}\text{Hg}$, $\delta^{201/198}\text{Hg}$, $\delta^{200/198}\text{Hg}$, y $\delta^{199/198}\text{Hg}$ frente a $\delta^{202/198}\text{Hg}$, extraídos de Bergquist y Blum.²⁴⁶

Cuando los isótopos de Hg experimentan MDF, siguen una línea recta, donde el valor de la pendiente equivale al valor del exponente de fraccionamiento β , que es característico del mecanismo de transformación. Al representar las curvas de tres isótopos se puede observar que el fraccionamiento de origen cinético proporciona pendientes, y por tanto valores de β , menos pronunciados que los procesos de equilibrio.^{224,247} En el caso de los isótopos impares que se dispersan de la línea de MDF, la magnitud del MIF (Δ^{xxx}) viene determinada por dicha desviación, y se cuantifica de acuerdo a la ecuación A.41. Los isótopos de Hg se fraccionan en múltiples reacciones biogeoquímicas, y hasta el momento se reconocen cuatro tipos de fraccionamiento: (i) el MDF, que se observa en casi todas las reacciones biológicas y abióticas; (ii) el MIF de isótopos impares causado por MIE, durante la reducción fotoquímica de Hg(II) y MeHg; (iii) el

MIF de isótopos impares causado por NVE, durante los procesos químicos de equilibrio y cinéticos (incluida la evaporación de Hg(0) y la reducción en oscuridad de Hg(II) por la materia orgánica); y (iv) el MIF de isótopos pares, de origen aún desconocido, aunque relacionado con procesos de oxidación fotoquímica de Hg(0). El gráfico más utilizado para explorar la variabilidad isotópica de Hg es el de $\Delta^{199}\text{Hg}$ (MIF) (o $\Delta^{201}\text{Hg}$) frente a $\delta^{202}\text{Hg}$ (MDF). Como se observa en la Figura A.41, el MDF entre diferentes muestras terrestres evaluadas presenta variaciones de hasta un 7‰ (-4.5 a +2.5‰ respecto al NIST 3133).²⁴⁸

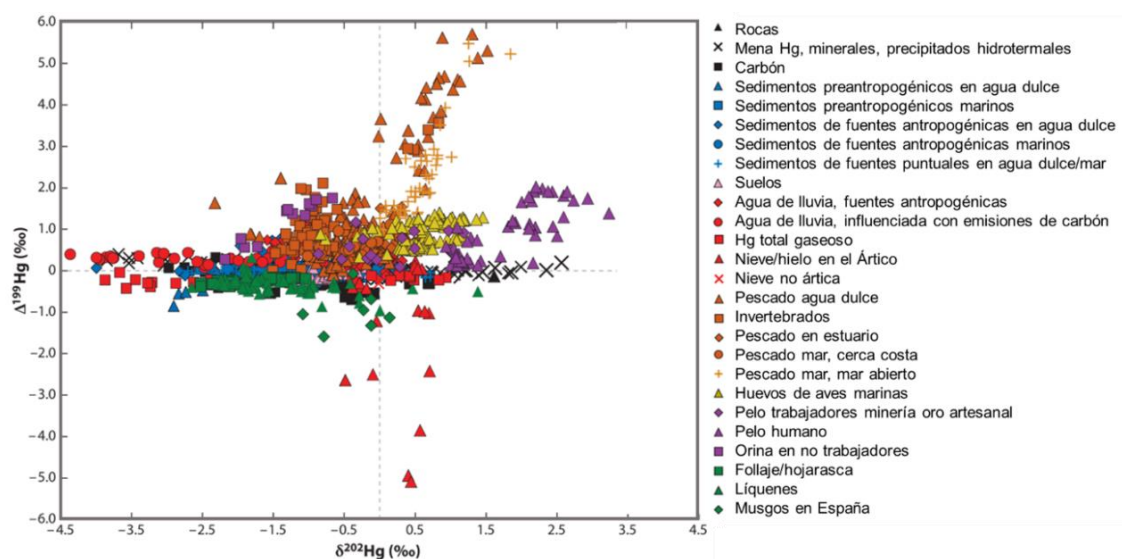


Figura A.41. Diagrama de $\Delta^{199}\text{Hg}$ frente a $\delta^{202}\text{Hg}$ para diferentes tipos de muestras, extraído de Blum *et al.*²⁴¹

Los valores de MIF de magnitud más positiva se asocian a organismos acuáticos los cuales han bioacumulado el MeHg residual rico en isótopos impares. La fotoreducción en presencia de materia orgánica disuelta produce una transferencia preferencial de los isótopos pares al Hg(0), dando MeHg residual con valores altos de $\Delta^{199}\text{Hg}$.^{246,249,258,250–257} Este MeHg residual es el que pasa posteriormente a la cadena trófica. El MIF muy negativo (deficiencia de masa impar) se da en Hg(II) de muestras de nieve y también se asocia a la reducción fotoquímica del Hg(II) a Hg(0). Pero en este caso son los isótopos impares los que se transfieren preferencialmente, con lo que el Hg(II) residual tendrá déficit de masa impar.^{259–261} También las muestras de líquenes y musgos presentan MIF negativo.^{262–264} Durante los procesos geológicos, el tipo de fraccionamiento más importante es dependiente de la masa y se debe a la

volatilización,^{265,266} la condensación y el transporte difusivo.^{267,268} Como se muestra en la Figura A.41,²⁴¹ se encontraron valores muy negativos de MDF ($\delta^{202}\text{Hg}=-3.0$ ‰) en muestras atmosféricas influidas por fuentes antropogénicas.^{238,269} En contraste, el MDF muy positivo en pelo humano, puede explicarse por el fraccionamiento inducido por la desmetilación que hace que el MeHg depositado en pelo sea “más pesado”, mientras que el Hg(II) excretado en orina es más ligero.^{91,249,270}

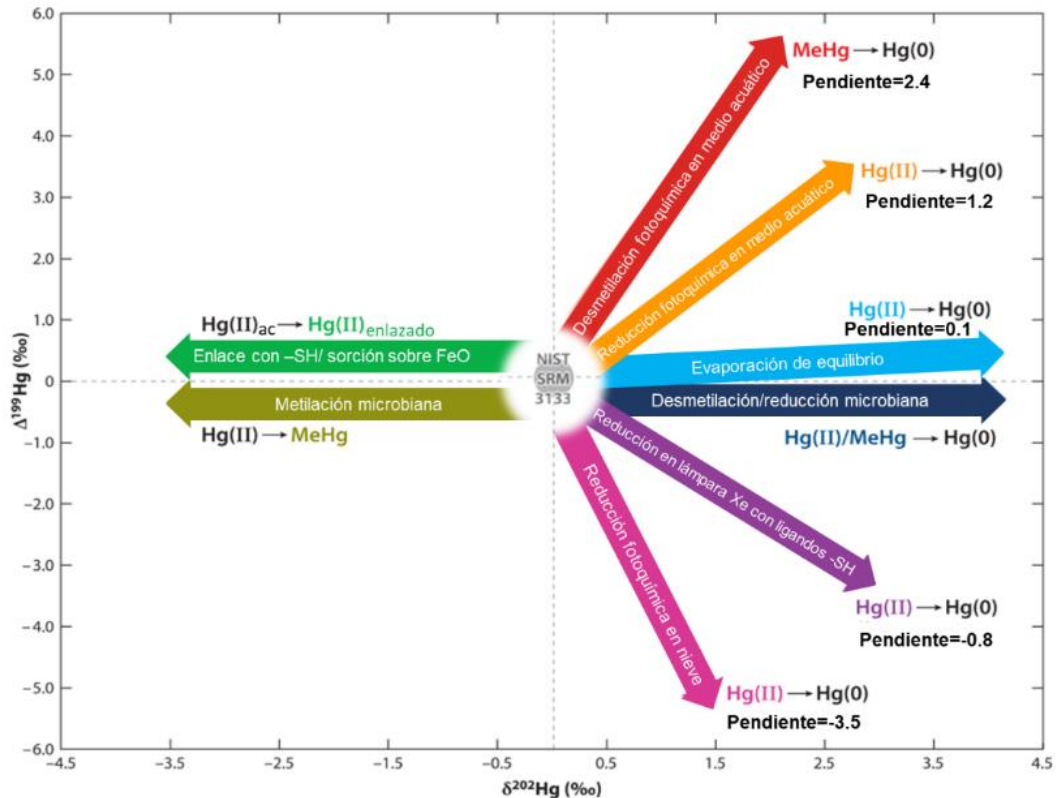


Figura A.42. Diagrama de $\Delta^{199}\text{Hg}$ frente a $\delta^{202}\text{Hg}$ en diferentes transformaciones experimentales, extraído de Blum *et al.* (2014).²⁴¹

En la Figura A.42 se muestra un resumen de distintos procesos que presentan diferente huella isotópica. Casi todas las reacciones cinéticas que involucran Hg generan productos con $\delta^{202}\text{Hg}$ más bajos (isotópicamente más ligeros) y dejan reactivos residuales con $\delta^{202}\text{Hg}$ más altos (isotópicamente más pesados). Los estudios experimentales indican que el MIF no se produce durante los procesos microbianos, ni en el interior de los organismos debido a la ausencia de luz.²⁷¹⁻²⁷³ A su vez, todas las reacciones fotoquímicas producen cambios tanto en MDF como en MIF. Los procesos de evaporación en equilibrio entre Hg(0) en fase líquida y Hg(0) en fase vapor producen un pequeño MIF por efecto de NVE, con pendiente de ~ 0.1 .^{274,275} Los reactivos

residuales de una reducción fotoquímica de Hg(II) y MeHg en medio acuático, en presencia de materia orgánica, siguen líneas de tendencia $\Delta^{199}\text{Hg}/\delta^{202}\text{Hg}$ con pendientes de 1.15 ± 0.07 (1 SE) y 2.43 ± 0.10 (1 SE) respectivamente.²⁴⁶ Este mismo efecto no se observa en ausencia de luz, donde predominantemente los isótopos experimentan MDF.²⁷¹ Lo que evidencia que los procesos de reducción en ecosistemas acuáticos están prioritariamente influenciados por el MIE, ya que siguen un mecanismo radicalario inducido fotoquímicamente.²⁴⁶ Esos mismos procesos en muestras de nieve del Ártico con Hg(II) residual dan pendientes de -3.5 ± 0.32 (1SE).²⁶¹ Con estos datos se observa que a medida que avanzan las reacciones, es posible identificar el tipo de proceso a partir de la pendiente de $\Delta^{199}\text{Hg}$ frente a $\delta^{202}\text{Hg}$. También los diagramas $\Delta^{199}\text{Hg}$ frente a $\Delta^{201}\text{Hg}$ permiten determinar comportamientos en los isótopos de Hg. Un proceso de reducción fotoquímica de Hg(II) da lugar a un residual cuya pendiente es 1.00 ± 0.01 (1 SE) en la dispersión de $\Delta^{199}\text{Hg}$ frente a $\Delta^{201}\text{Hg}$. La fotoreducción de MeHg da en cambio un residual de 1.36 ± 0.04 (1 SE). Las pendientes en el caso de muestras de tejido de peces 1.28 ± 0.03 (1 SE).²⁴⁶ En el caso de muestras de huevos de aves marinas y pelo humano, relacionadas con el consumo de pescado, se encuentra una línea de tendencia de pendiente 1.20 ± 0.02 .^{91,249,251,270,276} Estos diagramas pueden ser empleados en el caso de muestras donde los isótopos de Hg exhiban comportamiento asociado a la fotoreducción.²⁴¹

Las aplicaciones potenciales de los isótopos de Hg son extremadamente amplias debido a los múltiples tipos de fraccionamiento isotópico que pueden darse. El campo de la biogeoquímica de los isótopos estables de Hg se ha desarrollado íntegramente en la última década y hay múltiples aplicaciones que aún no se han explorado, como puede ser la utilización de los isótopos de Hg no solo como trazadores de los procesos por los que atraviesa el Hg sino como trazadores de procesos en los materiales, gases o seres vivos que contienen a ese Hg.

B. Objetivos

B.1. Objetivos

El ciclo biogeoquímico del mercurio en el medio ambiente se ha investigado intensamente a lo largo de las últimas cuatro décadas. Los niveles de Hg en la atmósfera siguen aumentando por emisiones naturales, pero especialmente por emisiones antropogénicas, como la quema de combustibles fósiles o la minería de oro artesanal. El comportamiento del Hg dentro de su ciclo biogeoquímico depende en gran medida de la forma química en la que se encuentre. Por ejemplo, en la interfase agua-sedimento, el Hg(II) depositado se metila por procesos mediados por bacterias y el MeHg resultante se bioacumula y biomagnifica a lo largo de la cadena trófica. Los seres humanos están expuestos a este compuesto tóxico principalmente debido al consumo de pescado. Sin embargo, la exposición ocupacional a mercurio a nivel industrial puede ser importante y por tanto debe ser controlada. Las agencias de Naciones Unidas, OMS y PNUMA han desarrollado una guía para identificar individuos expuestos a través de concentraciones en sangre, orina y pelo. Las normativas actuales que regulan y controlan el nivel de ciertas sustancias en alimentos, fluidos biológicos, materiales o muestras medioambientales demandan una elevada exactitud y precisión en la determinación de Hg y sus compuestos. La complejidad de las muestras y los bajos niveles de concentración en los que se encuentran los compuestos de Hg obliga a la utilización de tratamientos de muestra largos y complicados que pueden introducir errores importantes en el resultado final. En los últimos años se han desarrollado distintas metodologías para la determinación de Hg(II) y MeHg en diferentes muestras (por ejemplo, en agua, sedimentos, tejidos y/o fluidos biológicos, etc). Los métodos analíticos más comunes combinan una separación cromatográfica acoplada a la Espectrometría de Masas. Sin embargo, la determinación exacta y precisa de especies de mercurio en matrices complejas requiere el uso de metodologías analíticas modernas que permitan corregir la posible degradación de las especies de mercurio a lo largo del análisis químico.

El Análisis por Dilución Isotópica con Espectrometría de Masas (IDMS) es una técnica analítica que proporciona resultados con una alta calidad metrológica en comparación con métodos de medida más tradicionales y se considera un método absoluto de análisis directamente trazable al Sistema Internacional de unidades. Esta técnica de calibración se utiliza

para la certificación de materiales de referencia o para la validación de metodologías analíticas de inferior calidad metrológica basadas en métodos relativos. Actualmente, algunos laboratorios públicos y privados, han comenzado a implantar IDMS en análisis de rutina gracias a la creciente disponibilidad de elementos y compuestos enriquecidos isotópicamente. Cuando se aplica la dilución isotópica con trazadores isotópicos múltiples, se puede corregir la interconversión de las especies en el cálculo de su concentración, proporcionando una elevada exactitud.

Por otro lado, el estudio del fraccionamiento isotópico del Hg en la naturaleza es muy útil en la investigación del ciclo biogeoquímico del Hg y por tanto, para elucidar las diferentes vías de transformación de este elemento en el medio ambiente. Se sabe que la forma química en la que se encuentra el Hg determina en gran medida la movilidad, bioacumulación y toxicidad del Hg. Sin embargo, en la mayoría de los estudios de fraccionamiento isotópico se miden relaciones isotópicas de Hg total, ignorando la forma química en la que el Hg se encuentra en las muestras. Por ejemplo, la composición isotópica del MeHg sólo se ha estudiado en materiales en los que se espera una proporción muy elevada de MeHg (próxima al 100%) en comparación con las demás especies. El fraccionamiento isotópico del MeHg tiene un gran interés toxicológico ya que aún se desconocen muchos de los mecanismos por los que se origina en el medio ambiente. Hasta ahora la mayoría de los estudios en este campo se han focalizado en determinar el fraccionamiento isotópico que experimentan los isótopos de Hg tras el ataque total de la muestra lo que impide evaluar el fraccionamiento isotópico específico del MeHg. Además, el estudio del fraccionamiento isotópico del C del grupo metilo del MeHg puede aportar información acerca de su origen y transformaciones que experimenta en el medio ambiente. El estudio del fraccionamiento isotópico específico de distintos compuestos de Hg requiere el desarrollo de metodologías analíticas que permita la medida exacta y precisa de relaciones isotópicas utilizando técnicas cromatográficas acopladas a espectrómetros de masa de tipo multicolector.

Por todo lo dicho anteriormente, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de metodologías analíticas para la **Determinación de la concentración y el fraccionamiento isotópico de especies de mercurio en muestras biológicas mediante el**

acoplamiento de la Cromatografía de Gases a distintos espectrómetros de masas. Este objetivo general se ha dividido en los siguientes objetivos específicos:

1. Determinación de especies de mercurio en muestras biológicas por análisis de dilución isotópica con trazadores isotópicos múltiples.

El primer objetivo de la presente Tesis Doctoral se dividió a su vez en dos objetivos parciales:

1.1. Desarrollo de una metodología para la determinación de MeHg, EtHg y Hg(II) en muestras humanas por análisis de dilución isotópica utilizando un trazador isotópico triple y un protocolo común de preparación de muestra. La metodología a desarrollar debería permitir la determinación exacta y precisa de las tres especies de mercurio en sangre, orina y pelo y la corrección de las posibles interconversiones entre las especies durante las etapas del proceso analítico.

1.2. Desarrollo de una metodología dilución isotópica con trazador isotópico doble para la determinación y certificación de las concentraciones de MeHg y Hg(II) el material de referencia NIST SRM 1974c (tejido de mejillón fresco congelado). En esta certificación organizada por el NIST también se determinaron los valores de mono-, di-, tri-butilestaño en un rango de concentración similar al de las especies de Hg.

2. Medida de los niveles de especies de Hg en muestras humanas y estudio de su distribución en el organismo.

Este segundo objetivo se dividió en dos objetivos parciales:

2.1. Estudio de la adsorción de Hg(0) al pelo humano tras una exposición ocupacional empleando ablación laser y cromatografía de gases acopladas a espectrometría de masas.

2.2. Estudio de los niveles de Hg(II), MeHg y EtHg en sangre, orina y pelo de 17 individuos altamente intoxicados por Hg(0) tres años después de un accidente laboral y de sus parientes más próximos (grupo control) formado por 10 familiares no expuestos ocupacionalmente.

3. Desarrollo de una metodología para la medida exacta y precisa de relaciones isotópicas específicas del compuesto mediante Cromatografía de gases acoplada a un Espectrómetro de Masas de tipo multicolelector con fuente de plasma ICP (MC-ICP-MS)

Este tercer objetivo se dividió en los siguientes objetivos parciales:

3.1. Optimización del acoplamiento de la cromatografía de gases al sistema MC-ICP-MS para la medida exacta y precisa de relaciones isotópicas de especies de Hg.

3.2. Evaluación de la precisión obtenida en los valores delta específicos del Hg(II) a partir de la medida de relaciones isotópicas específicas de Hg(II) en el patrón "delta cero" NIST 3133 mediante GC-MC-ICP-MS

3.3. Evaluación de la exactitud obtenida en los valores delta específicos del Hg(II) mediante la medida de relaciones isotópicas de Hg(II) en el NIST RM 8610 relativas al NIST 3133 mediante GC-MC-ICP-MS

4. Desarrollo de una metodología para la medida exacta y precisa de relaciones isotópicas de C en el MeHg mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas de relaciones isotópicas (GC-IR-MS).

Este objetivo fue realizado en colaboración con el centro GET (Géosciences Environnement Toulouse) perteneciente al CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique, Francia) y se compone de los siguientes objetivos parciales:

4.1 Puesta a punto y optimización de los parámetros experimentales de un nuevo sistema de purga y trampa acoplado al GC-IRMS que permitirá la medida exacta y precisa de relaciones isotópicas de C. .

4.2. Evaluación del fraccionamiento isotópico y la linealidad producido por el sistema a diferentes niveles de concentración durante la transferencia de las especies de Hg (CH₃Hg y Hg(II)). Optimización de las condiciones del procedimiento de derivatización y evaluación del empleo de Hg(II) como estándar interno.

4.3. Comparación del valor $\delta^{13}\text{C}$ del metilmercurio (CH₃Hg) con el valor obtenido para un patrón preparado a partir de la misma sal de CH₃Hg, en un trabajo previo por GC-C-IRMS con inyección líquida.

C. Experimental

C.1. Instrumentación

C.1.1. Cromatógrafo de gases

A lo largo de la presente tesis doctoral se ha empleado un cromatógrafo de gases modelo Agilent 6890N (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) (Figura C.1.), el cual se acopló a los distintos instrumentos ICP-MS. Este cromatógrafo se encuentra equipado con una columna capilar DB-5MS Agilent J&W Scientific con un relleno de un 95% de dimetilsiloxano entrecruzado con un 5% difenilo. Las dimensiones de la columna son 30 m de longitud, 1 μm de espesor de la capa de relleno y 0.53 mm de diámetro interno. Este diámetro interno ha mostrado tener una alta capacidad en la separación de los compuestos de mercurio, dando lugar a picos gaussianos sin ensanchamientos. El modo de inyección empleado es el modo sin división de flujo (*splitless*). Las condiciones empleadas para este sistema se detallan en la Tabla C.1. para la separación cromatográfica de las especies de Hg(II), MeHg y EtHg. La adquisición tiene lugar en unos 6 minutos mientras que el programa completo dura unos 12 min. En la determinación de MeHg y Hg(II) en el material SRM 1974c la columna cromatográfica empleada era columna capilar DB-5MS Agilent J&W Scientific con un relleno de un 95% de dimetilsiloxano, pero un diámetro interno de 0.25 mm. En este caso se emplearon una temperatura inicial de 60°C (50°C para los compuestos de butilestaño) y una única rampa de temperatura de 40°C min hasta 250°C.



Figura C.1. Imagen del cromatógrafo de gases Agilent 6890N

Tabla C.1. Parámetros experimentales del sistema de cromatografía de gases para la separación de las tres especies de mercurio (MeHg, EtHg y Hg(II)) por GC-ICP-Q-MS.

GC System	Agilent 6890N
Temperatura inicial	70°C (1 min)
Rampa de temperatura 1	70-120°C to 40°C min ⁻¹
Rampa de temperatura 2	120-150°C to 10°C min ⁻¹
Rampa de temperatura 3	150-250°C to 40°C min ⁻¹
Temperatura final	250°C (1 min)
Tiempo de adquisición	6 min
Temperatura en interfase	275°C
Temperatura inyector	250°C
Volumen de inyección	2 µL

En el caso de la separación cromatográfica para las especies de MeHg y Hg(II) en la determinación de relaciones isotópicas de Hg ($\delta^{xxx}\text{Hg}$), los parámetros se muestran en la Tabla C.2. En este caso se han comparado tres programas de temperaturas con el objetivo de conseguir una mejora en la medida de las relaciones isotópicas en la señal transiente, como se detallará más adelante (Sección D.3).

Tabla C.2. Parámetros experimentales del sistema de cromatografía de gases para la separación de las dos especies de mercurio (MeHg y Hg(II)) por GC-MC-ICP-MS.

GC System	Agilent 6890N		
Gas de arrastre	He		
Flujo	1 mL/min		
Temperatura de la interfase	270 °C		
Temperatura del inyector	250 °C		
Volumen de inyección	2 µL		
Programa de temperatura	Pico estrecho	Pico ancho	
	<i>Programa 1</i>	<i>Programa 2</i>	<i>Programa 3</i>
Temperatura inicial	60°C (1 min)	45°C (7 min)	45°C (1 min)
Rampa 1	60 → 250°C (40°C min)	45 → 63°C (50°C/min)	45 → 74°C (50°C/min)
Temperatura final 1	250°C (1 min)	63°C (7 min)	74°C (7 min)
Rampa 2	-	63 → 250 °C (50C/min)	74 → 250 °C (50C/min)
Temperatura final 2	-	250°C (1 min)	250°C (1 min)
Tiempo de adquisición	6.8 min	19.1 min	13.1 min

C.1.2. ICP-MS de tipo cuadrupolo

El equipo de ICP-MS empleado en este trabajo es de tipo cuadrupolo Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón) (Figura C.2). Este instrumento está equipado con una celda de colisión/reacción de tipo octapolo (ORS) que facilita la eliminación de las interferencias poliatómicas. Aunque es conveniente destacar que a lo largo de todo este trabajo no se presurizó la celda, y se operó en “*reaction mode off*”. Para la optimización de los parámetros de posición de la antorcha, la eficiencia de ionización y la resolución de masas, se empleó una disolución de ajuste que contenía $1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ de Li, Y, Tl y Ce en HNO_3 1% (v/v). Esta disolución se introdujo por una bomba peristáltica a través de un nebulizador concéntrico tipo *Meinhard*. La cámara de nebulización es de doble paso tipo *Scott*, y se encuentra refrigerada a 4°C , mediante un sistema *Peltier*. La antorcha, tipo *Fassel*, es de cuarzo con tres tubos concéntricos. El tubo inyector era de 1,5 mm de diámetro interno. Los isótopos medidos en la optimización de los parámetros instrumentales fueron ^7Li , ^{89}Y y ^{205}Tl , cubriendo así un amplio rango de masas. También se midió la relación $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}$ para controlar la contribución de óxidos, y la relación $^{70}\text{Ce}^{2+}/^{140}\text{Ce}^+$ para minimizar la contribución de las especies doblemente cargadas. El analizador para este espectrómetro de masas es de tipo cuadrupolo y dispone de un detector de multiplicador de electrones secundarios, que permite la detección secuencial en modo digital o analógico, dependiendo del flujo de iones. Algunos de los parámetros instrumentales del ICP-MS se encuentran detallados en la Tabla C.3, el resto son optimizados diariamente.

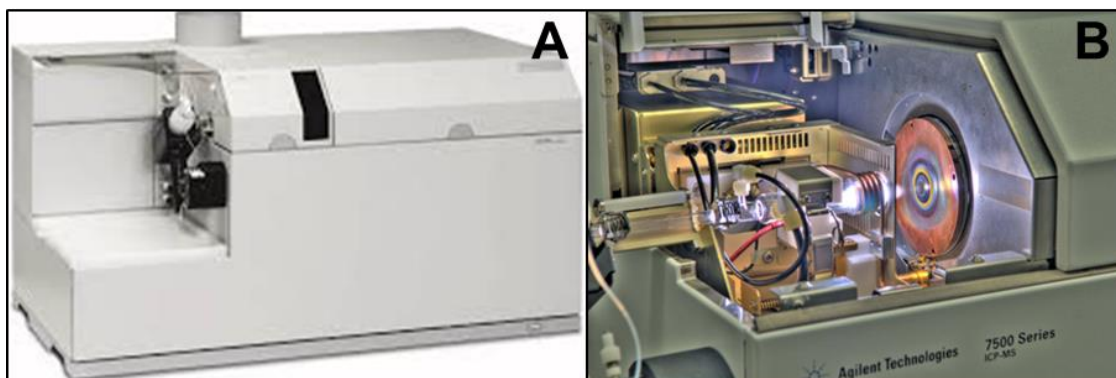


Figura C.2. Imagen del espectrómetro de masas Agilent 7500ce (A) y detalle del módulo de la fuente de ionización donde se forma el plasma (B).

Tabla C.3. Parámetros experimentales del ICP-Q-MS para la medida de las relaciones isotópicas de las especies de mercurio previa separación por GC.

<i>ICP-MS</i>	<i>Agilent 7500ce</i>
Flujo de gas de arrastre	1.12 L min ⁻¹
<i>Octapole bias</i>	-16 V
<i>QP Bias</i>	-18 V
Tiempo de integración	0.08 s
Modo de adquisición	<i>Time resolved analysis</i>
Isótopos de Hg medidos	198, 199, 200, 201, 202

➤ **Acoplamiento GC-ICP-Q-MS**

El acoplamiento entre el GC y el ICP-MS se realiza a través de una interfase, consistente en un bloque metálico calentado a 270°C. El bloque, en su parte superior tiene dos conexiones, una de entrada y otra de salida. El Ar de arrastre del ICP-MS que va a la cámara de nebulización, se conecta mediante un tubo de PFA a la conexión de entrada, como se muestra en la Figura C.3.A.

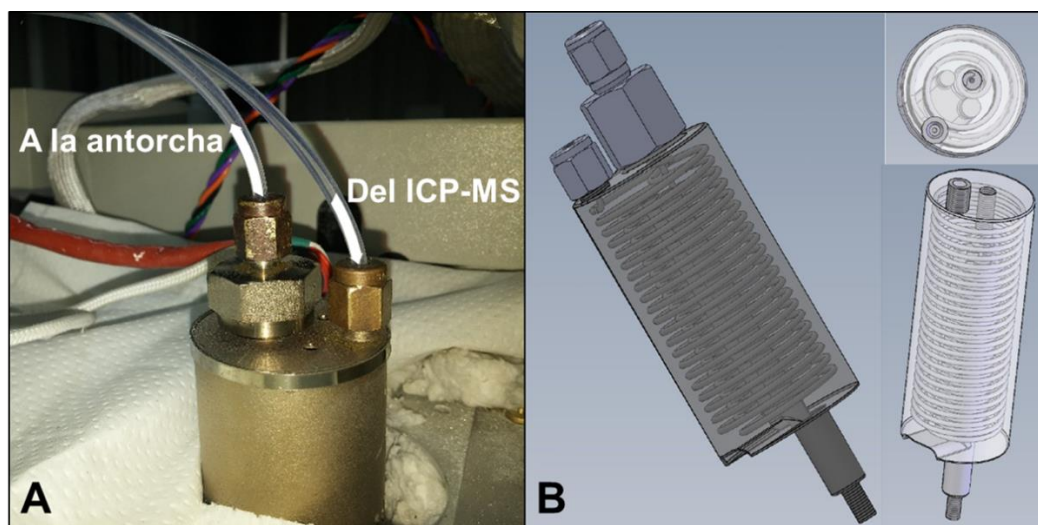


Figura C.3. Imagen de la interfase GC-ICPMS situada sobre el cromatógrafo de gases con el sentido de los flujos de Ar (A) y el diseño de la interfase en detalle (B).

En la conexión de salida, en contacto con el final de la columna cromatográfica, se conecta otro tubo de PFA. De este modo, el Ar que entra en la interfase pasa a través de un tubo helicoidal situado en torno a la columna, con lo que se calienta para, posteriormente transportar los analitos por el otro tubo de PFA hacia la antorcha. Con este diseño se minimiza la condensación de los analitos en el tubo (Figura C.3.B). El tubo de PFA, debe ser reemplazado regularmente, para evitar cualquier tipo de retención por compuestos que se hayan depositado a lo largo del tubo. En la Figura C.4.A se muestra la imagen del ICP-MS 7500ce acoplado al GC 6890N de Agilent, a través de la interfase detallada.

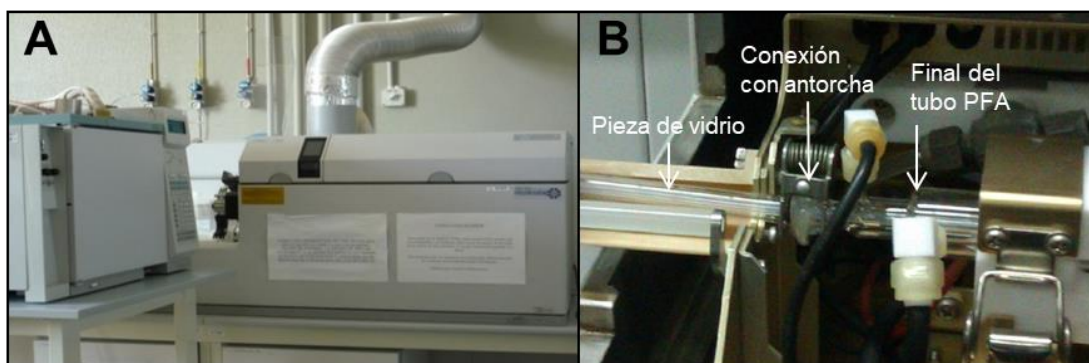


Figura C.4. Imagen del acoplamiento GC-ICPMS (A) y de la introducción del tubo de PFA desde la interfase a la antorcha (B).

En este diseño, se trabaja en condiciones de plasma seco, con lo que la cámara de nebulización ha sido retirada y solo se emplea en el paso previo de optimización de los parámetros del ICP-MS. El tubo de PFA se conecta a la antorcha gracias a una pieza de vidrio sellada con un *o-ring*, de la forma en que se muestra en la Figura C.4.B.

C.1.3. ICP-MS de doble enfoque tipo multicolector

A lo largo de este trabajo se ha utilizado un equipo de doble enfoque tipo multicolector (Neptune Plus) el cual se muestra en la Figura C.5.A. Este sistema tiene un analizador de masas de doble enfoque, formado por un sector electrostático y un sector magnético en configuración Nier-Johnson directa. El equipo se encuentra configurado en tres módulos conectados entre sí: (i) módulo de plasma de acoplamiento inductivo (Módulo ICP); (ii) módulo de sector electrostático (Módulo ESA); y (iii) módulo de sector magnético y multicolección (Módulo Multicolector). Esta

configuración se muestra detallada en la Figura C.5.B. El sector electrostático es el encargado de filtrar los iones, de modo que sólo aquellos con una Energía cinética determinada sean focalizados en la rendija de salida. Este equipo presenta la capacidad de hacer medidas en baja, media o pseudo-alta resolución; para ello tiene 3 tamaños de rendija de entrada antes del analizador electrostático. En este trabajo el modo de operación ha sido en baja resolución. En el sector magnético se separan los iones transmitidos por el ESA, en función de su relación m/z . Los iones se transmiten posteriormente al sistema de multicolección, para su detección simultánea. Como se ha descrito anteriormente, el radio de la trayectoria descrita por un ion en el seno de un campo magnético, manteniendo fijo el valor del campo y el potencial de aceleración, es función de su relación m/z . Esta geometría permite una detección multiisotópica simultánea en un rango de masas de $\pm 8.5\%$ con respecto de la masa de la copa central. Por tanto, al colocar un conjunto de detectores a la salida del imán, se puede llevar a cabo la detección simultánea de un cierto número de iones generados en el plasma, dentro de un rango de masas definido por la geometría del sistema.

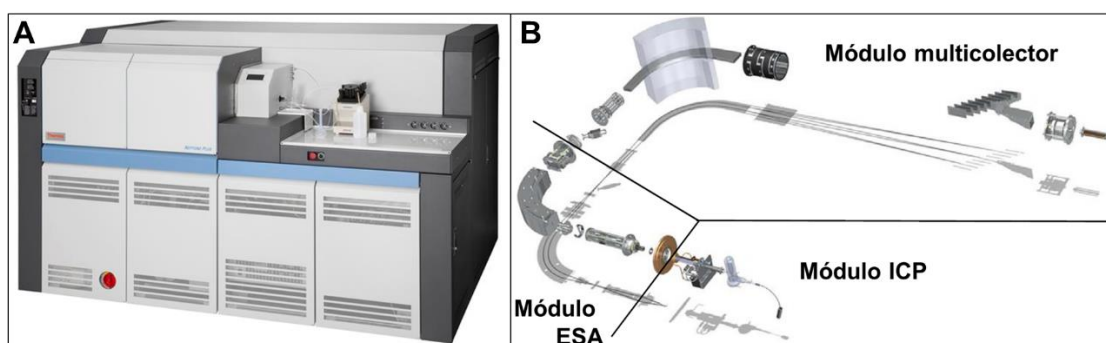


Figura C.5. Imagen del espectrómetro de masas Neptune Plus (A) y representación esquemática de sus componentes (B).

En el caso del Neptune Plus la copa central es fija y las otras ocho pueden variar su posición en torno a ella. Los parámetros empleados en el sistema MC-ICP-MS se muestran en la Tabla C.4. Cabe destacar que solo fue necesario el uso de 7 copas de Faraday para las medidas a las masas 198, 199, 200, 201 y 202 del mercurio y 203 y 205 del talio.

Tabla C.4. Parámetros experimentales del MC-ICP-MS para la medida de las relaciones isotópicas de las especies de mercurio previa separación por GC.

<i>MC-ICP-MS</i>	<i>Thermo Scientific - Neptune Plus</i>								
Potencia RF	1200 W								
Modo de resolución	Media								
Tiempos de integración	<i>Picos estrechos</i>			<i>Picos anchos</i>					
	0.131 s	0.262 s	0.524 s	1.049 s					
Ciclos/Bloques	2500/1	1200/1	1200/1	600/1					
Ar interfase GC (L min ⁻¹)	Los flujos de Ar que van a la interfase GC y a la cámara de nebulización son optimizados en cada sesión de medida								
Ar nebulización (L min ⁻¹)									
Lentes iónicas	Voltajes optimizados para la mejor señal/ruido del ²⁰⁵ Tl								
Posición de la Antorcha (X. Y. Z)	L4	L3	L2	L1	C	H1	H2	H3	H4
Configuración de las Copas de Faraday	---	198	199	200	201	202	203	205	---

➤ Acoplamiento GC-MC-ICP-MS

Para las medidas de relaciones isotópicas se trabajó en condiciones de plasma húmedo, introduciendo una disolución de Tl en línea con la entrada de los analitos desde la columna de GC. Esta disolución de Tl permite corregir la discriminación de masas en la medida de relaciones isotópicas de Hg a lo largo de todo el cromatograma. En este caso el sistema cromatográfico Agilent 6890N se acopla al MC-ICP-MS empleando la misma interfase que en el acoplamiento GC-ICP-Q-MS (Figura C.6).



Figura C.6. Imagen del GC acoplado al MC-ICP-MS (Neptune Plus)

La corrección en continuo evita posibles variaciones inducidas en el TI durante la elución del pico de Hg que puedan dar lugar a un error en la corrección. Además, el plasma húmedo evita la acumulación de partículas de carbón en los conos de muestreo y extracción, lo que podría afectar a la transmisión de los iones a lo largo de la sesión analítica. La entrada de la disolución acuosa conteniendo TI, hace que la combustión sea más eficiente debido al O proveniente del agua y por tanto la acumulación de partículas es menor. La disolución se introduce mediante un nebulizador concéntrico de PFA de $700 \mu\text{L min}^{-1}$ por autoaspiración, y una cámara de nebulización ciclónica. Esta cámara se encuentra conectada a una pieza en forma de Y, con dos canales, uno para la introducción del TI por nebulización y la otra para la introducción del tubo de PFA procedente de la interfase del GC, por donde circulan los analitos (Figura C.7).

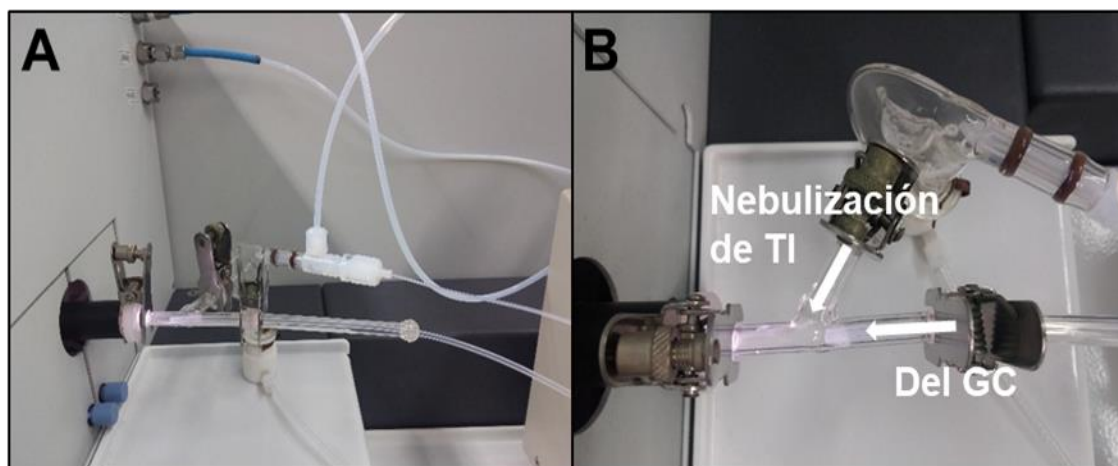


Figura C.7. Imagen de la conexión entre GC- MC-ICP-MS en la pieza de vidrio en forma de Y (A) y detalle de los flujos que circulan por cada canal (B).

La optimización de los flujos de Ar tanto en la interfase para transportar a los analitos hacia la antorcha, como en la cámara de nebulización debe realizarse diariamente. El esquema general de la configuración analítica empleada en este trabajo se muestra en la Figura C.8.

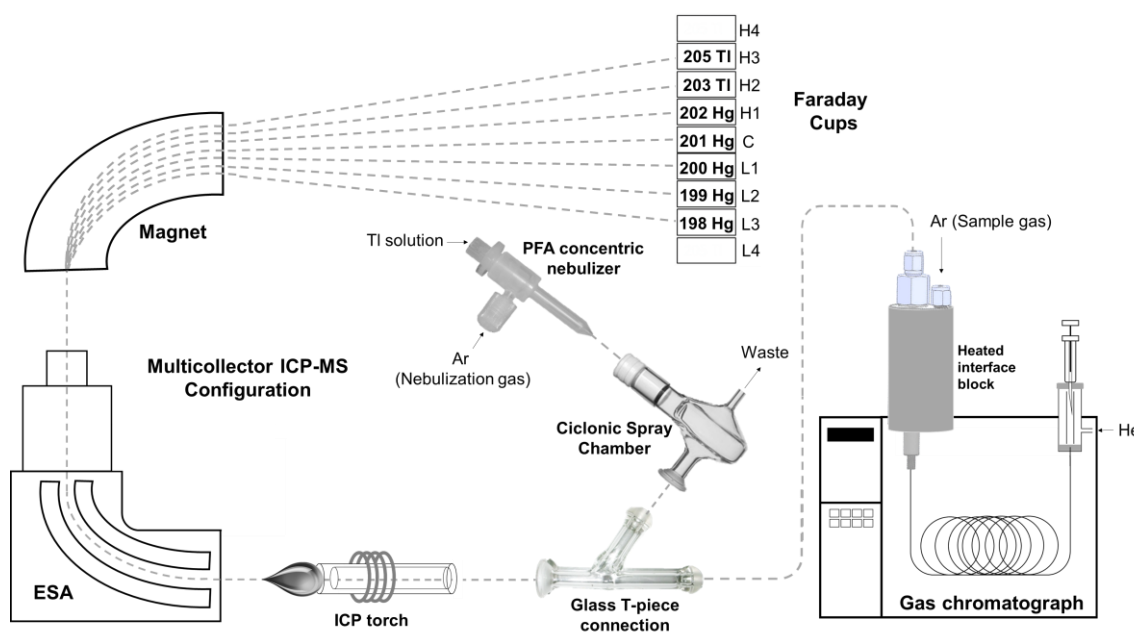


Figura C.8. Configuración analítica del GC-MC-ICP-MS utilizado en este trabajo para la medida de relaciones isotópicas de Hg específicas del compuesto

C.1.4. GC-IRMS

Las medidas de $\delta^{13}\text{C}$ se realizaron por espectrometría de masas de relaciones isotópicas con celda de combustión y acoplada a cromatografía de gases (GC-C-IRMS). El sistema GC-IRMS empleado en este trabajo es un Trace GC Ultra acoplado al MAT 253 IRMS (Thermo Scientific), con una interfase de acoplamiento Isolink GC (Figura C.9). Esta es una técnica instrumental altamente especializada para determinar la relación relativa de isótopos estables de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$), pero también de hidrógeno ($^2\text{H}/^1\text{H}$), nitrógeno ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) u oxígeno ($^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$) en compuestos individuales separados de mezclas a menudo complejas. El sistema consta de cuatro partes diferenciadas: (i) cromatógrafo de gases; (ii) interfase de acoplamiento GC-Isolink; (iii) interfase Conflo IV y (iv) espectrómetro de masas. El GC se encuentra equipado con una columna capilar DB-5MS Agilent J&W Scientific con un relleno de un 95% de dimetilsiloxano entrecruzado con un 5% difenilo. Las dimensiones de la columna son 30 m de longitud, 1 μm de espesor del relleno y 0.25 mm de diámetro interno.

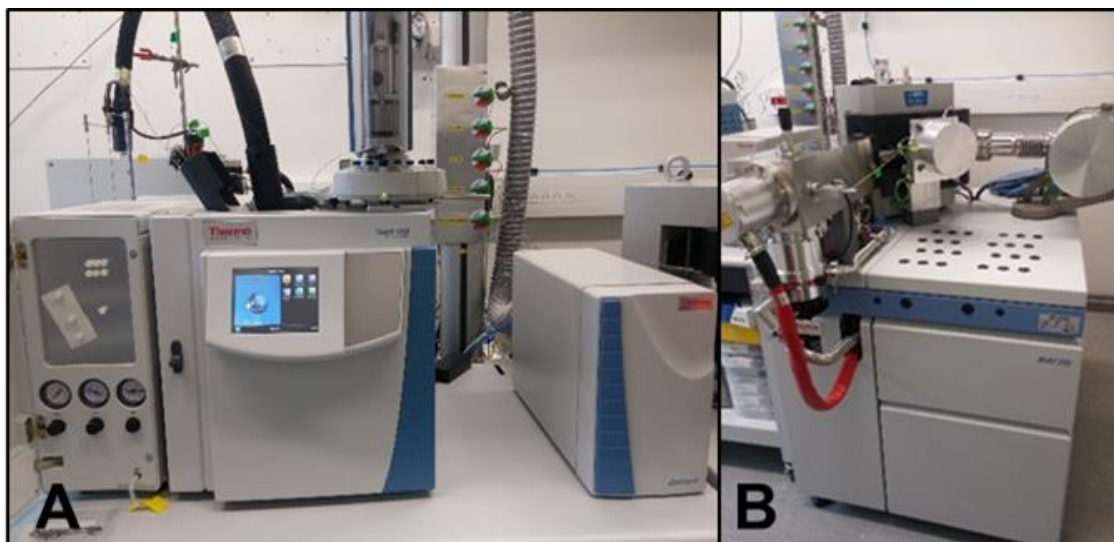


Figura C.9. Imagen del equipo GC con interfases Isolink (A) acoplado al IRMS MAT 253 (B) empleado en este trabajo.

En la Figura C.10 se muestra un esquema de un equipo de estas características, configurado para la medida de relaciones isotópicas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. El cromatógrafo de gases se encuentra conectado al analizador a través de la interfase GC-Isolink. Esta interfase se compone del reactor de combustión, una serie de válvulas para gases y un sistema de eliminación de agua.

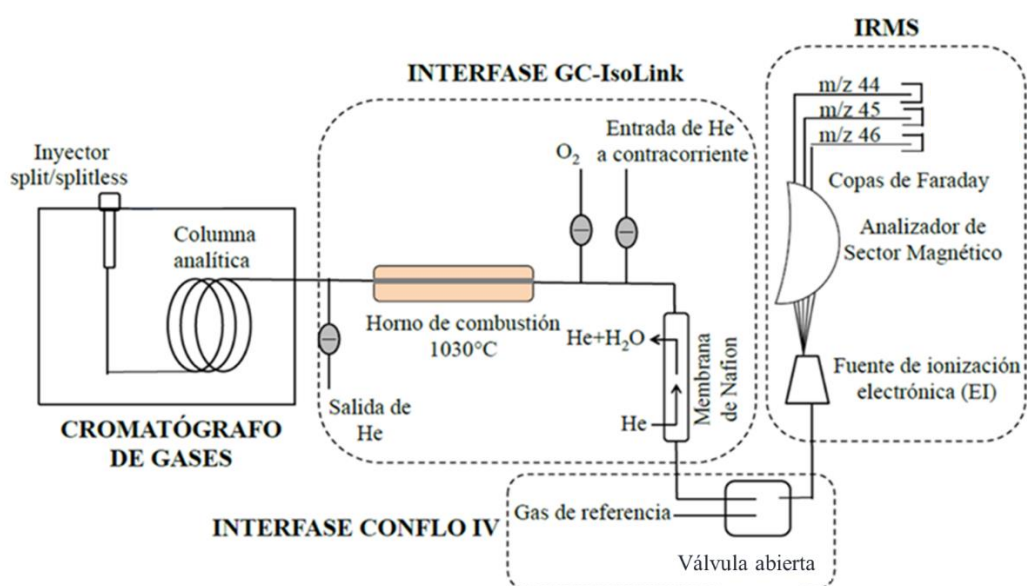


Figura C.10. Esquema del equipo comercial GC-Combustión-IRMS para la medida de alta precisión de relaciones isotópicas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$.

Los compuestos de C que eluyen en la columna cromatográfica pasan a través de un reactor de combustión. Este reactor es un tubo de alúmina que contiene óxidos de Cu y Ni e hilos de Pt como catalizador y se encuentra dentro de un horno a alta temperatura (1030°C). A esta temperatura los óxidos de Cu y Ni son capaces de oxidar de forma cuantitativa a los compuestos orgánicos que pasan por el reactor obteniéndose CO₂. Dado que los óxidos de Cu y Ni pasan de nuevo a su estado elemental en el transcurso de la reacción, es necesario programar una reoxidación del Cu y en Ni en el reactor para que éste recobre su eficiencia. Esta reoxidación se realiza haciendo pasar por el reactor un flujo de O₂ (0.5 mL min⁻¹) a contracorriente durante unas 4 horas, Dependiendo del uso del equipo el reactor se ha de reoxidar aproximadamente una vez por semana. Además de CO₂, en la combustión se genera agua como subproducto. Esta agua puede producir interferencias isobáricas para m/z 45, por lo que sería una fuente de error en la medida de relaciones isotópicas de ¹³C/¹²C. Para su eliminación se emplea una membrana semipermeable selectiva de fluoroplímero sulfonado (Nafion), a la salida del reactor. Esta interfase posee además un sistema de eliminación del disolvente. La entrada de He a contracorriente (*Backflush*) en el reactor, evita el acceso del disolvente. El modo *backflush* suele activarse al principio y al final de cada análisis, y una vez que pasa elimina el disolvente, el sistema vuelve al modo directo para que los analitos alcancen la fuente de ionización. Este modo también se utiliza para la reoxidación del reactor.

En esta configuración instrumental existe una segunda interfase, Conflo IV que se sitúa entre la membrana de Nafion y el IRMS. Esta interfase es la encargada del control de los gases, de modo que el gas de referencia (en este caso CO₂) entre al IRMS en las mismas condiciones de presión que el flujo de muestra del GC. La combustión de moléculas orgánicas incrementa el volumen de gas, y para evitar una sobrepresión que alcance la fuente de IRMS, y produzca fraccionamiento, la muestra se introduce mediante una interfase de división abierta. Este dispositivo de control permite obtener medidas de relaciones isotópicas de alta precisión. La ionización del CO₂, obtenido en la combustión, se logra utilizando una fuente de ionización electrónica (EI) que ya se ha descrito en la sección A.2. Los parámetros empleados en el sistema GC-IRMS se muestran en la Tabla C.5.

Tabla C.5. Parámetros experimentales del GC-IRMS.

GC-IRMS	Thermo GC Isolink-Conflo IV
Columna	Agilent DB-5MS (30m, 0.25mm I.D., 0.25 μ m)
He (gas de arrastre)	14.5 psi
Temperatura inicial	40°C (1 min)
Rampa de temperatura 1	70-100°C to 5°C min ⁻¹ (MeHg/Hg(II)) 40-80°C to 5°C min ⁻¹ (BTEX)
Rampa de temperatura 2	50°C min ⁻¹
Temperatura final	250°C (1 min)
Detección picos	Pendiente inicial: 0.4 mV s ⁻¹
ISODAT	Pendiente final: 0.2 mV s ⁻¹
Método " <i>Individual Background</i> "	Fondo: 5 s

Este equipo consta de una fuente de ionización electrónica (EI), un analizador de masas de sector magnético y un detector con tres copas de Faraday que permite la medida simultánea de tres masas consecutivas. Los gases ionizados se separan en un único analizador de sector magnético en virtud de su momento y se detectan mediante un conjunto de tres copas de Faraday, cuya salida se utiliza para calcular la relación de isótopos estables finales. El software del equipo GC-IRMS Isodat (Thermo Fisher Scientific) no sólo permite la integración de los picos cromatográficos, sino que realiza directamente el cálculo del $\delta^{13}\text{C}$.

C.1.5. Sistema de purga y trampa

El sistema de GC-IRMS empleado en este trabajo, se ha equipado con una unidad de purga y trampa (modelo VSP4000, IMT Innovative Messtechnik, Vohenstrauß, Alemania) directamente conectado a la columna de GC (Figura C.11.) Una de las ventajas de este sistema es que permite separar los analitos de la mayor parte de los componentes presentes en la matriz, puesto que sólo se evaporan aquellos que sean volátiles en el mismo rango de T que los analitos. Se elimina la entrada de disolvente orgánico puesto que los analitos van diluidos en agua.

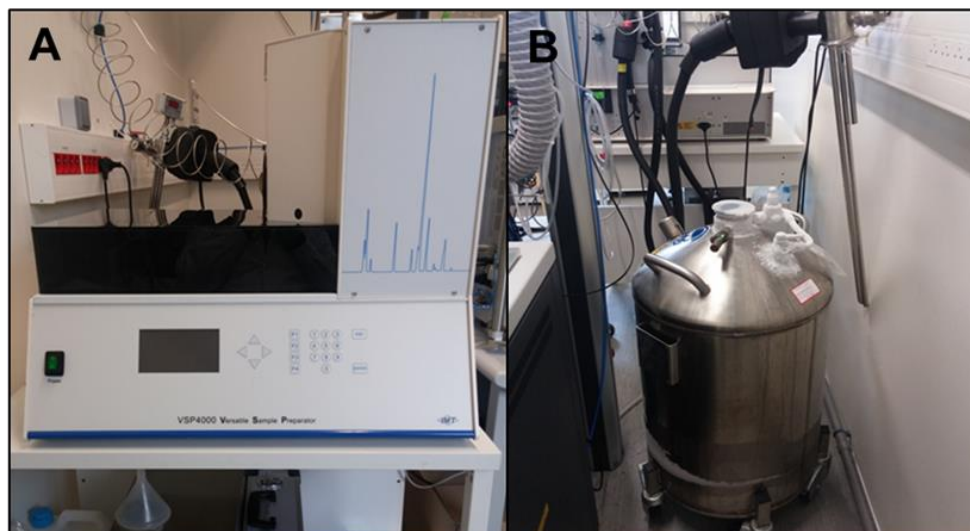


Figura C.11. Imagen del sistema de purga y trampa VSP (A) e imagen del sistema de refrigeración con N_2 líquido (B).

El sistema de purga y trampa consiste en una cavidad termostatazada donde se introduce el vial con la muestra en fase acuosa. A través del septum se introducen dos agujas, creando un flujo de He que pasa a través de la disolución y transfiere los analitos a una primera trampa de agua (*Peltier Water trap*, PWT), como se muestra en la Figura C.12. Esta trampa, donde quedará retenida el agua evaporada, se mantiene a -15°C y se controla a través de un mini-refrigerador de agua. Los analitos no quedarán retenidos y llegarán a la trampa criogénica. Esta trampa consiste en un cilindro relleno con Tenax, que se enfría hasta -50°C mediante un sistema N_2 líquido. A continuación, se producirá la desorción térmica de los analitos a 235°C , que pasarán al GC a través de una línea de transferencia calentada a 280°C .

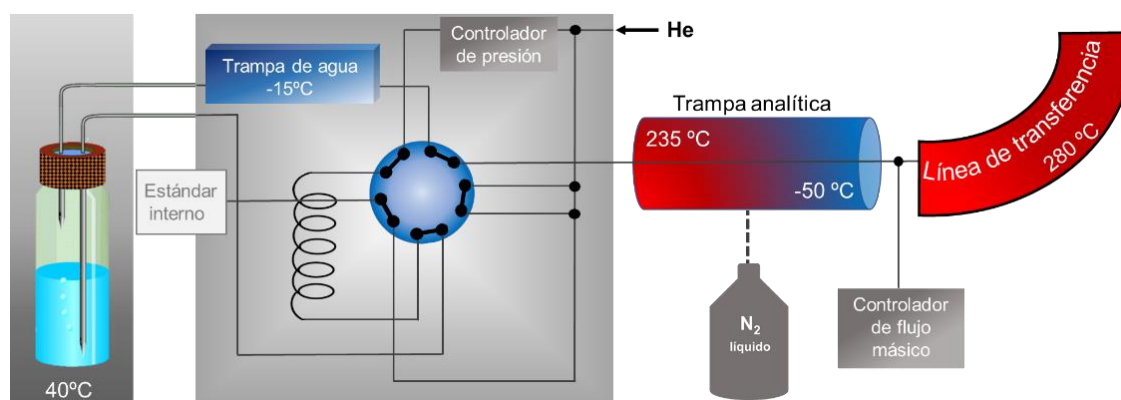


Figura C.12. Esquema del sistema de Purga y trampa empleado en este trabajo

Los parámetros del sistema se detallan en la Tabla C.6. Una válvula de 10 vías se encarga del control de los flujos. Este equipo también permitiría la introducción en línea de un estándar interno que se mezclaría con los analitos.

Tabla C.6. Parámetros instrumentales del sistema PT-GC-C-IRMS.

Sistema de Purga y Trampa	
Presión de He	1500 mbar
Flujo de purga (mL min ⁻¹)	20
Tiempo de purga (min)	20
Temperatura muestra (°C)	40
Temperatura Trampa de agua (°C)	-15
Temperatura trampa analítica (°C)	-50
Temperatura de desorción (°C)	235
Tiempo de desorción (min)	2
Temperatura línea de transferencia (°C)	280

C.1.6. LA-ICP-MS

El sistema de ablación láser que se acopló al ICP-MS de tipo cuadrupolo, es un modelo CETAC LSX-213 (Omaha, NE, Estados Unidos) equipado con un láser de Nd:YAG operando en el ultravioleta lejano (213 nm) (Figura C.13). La cámara de ablación, con un volumen efectivo de 60 cm³, está situada sobre una plataforma que permite su movimiento en los ejes X-Y dejando libre el eje Z para enfocar el láser a través de una cámara CCD controlada vía software. Cuando un láser de ultravioleta se enfoca sobre una pequeña superficie del pelo se consigue la volatilización de los componentes del pelo que se arrastran con un flujo de He hacia la fuente de ionización del espectrómetro de masas, en este caso ICP-MS.



Figura C.13. Equipo de ablación láser modelo CETAC LSX-213

Este transporte se realiza mediante un tubo de Tygon de alta pureza revestido de Teflón (1/4" de diámetro externo y 1/8" de diámetro interno). En condiciones de plasma seco, el tubo se conecta directamente a la antorcha. El sistema de ablación láser (LA) se acopló a un instrumento ICP-MS Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokio, Japón). El esquema completo del acoplamiento del sistema de LA-ICP-MS es equivalente al presentado en la Figura C.14, extraído de Günther y Hattendorf.²⁷⁷

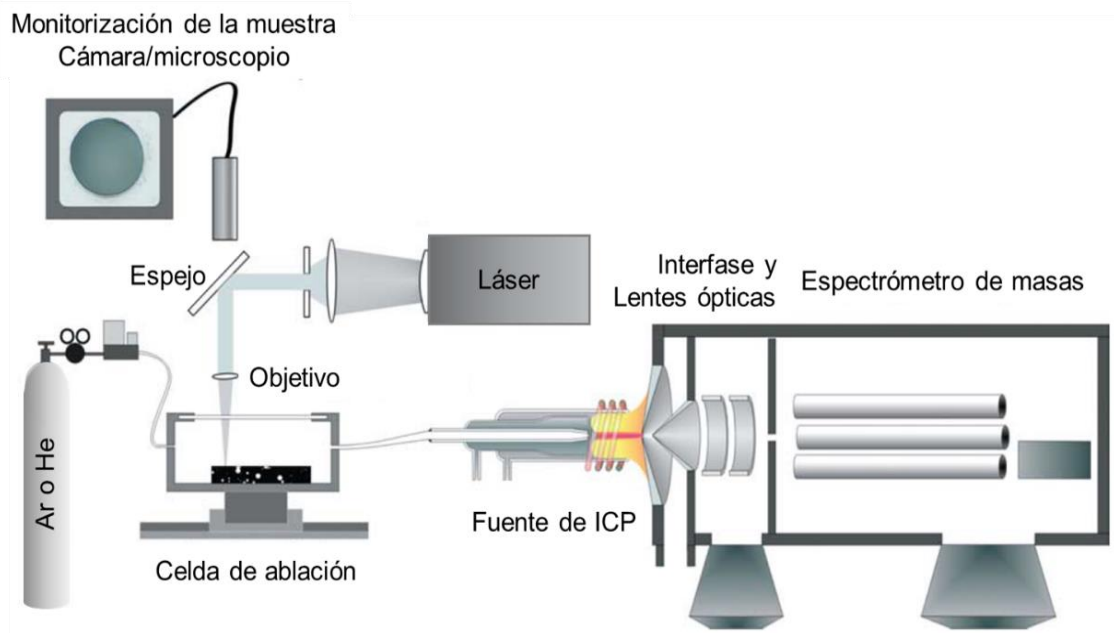


Figura C.14. Esquema general del sistema de LA-ICP-MS extraído de Günther & Hattendorf.²⁷⁷

La energía del láser es modulable en el rango 0-100 % con un valor máximo de 5.6 mJ, y en este trabajo ha sido del 20% de la nominal. La frecuencia de disparo (10 Hz), la velocidad de barrido, el número de disparos o el retardo del disparador, son controlados a través del programa Digilaz 213. Las medidas se realizaron mediante análisis de punto único con un tamaño de punto de 50 μm y un total de 100 disparos de ablación con láser por punto (aproximadamente 10 s de tiempo de ablación). Se seleccionó un retraso de 10 segundos desde el inicio de las mediciones para obtener datos de fondo antes del pico de ablación. Las mediciones de punto único se realizaron cada 1 mm desde la raíz hasta la punta del cabello. Los isótopos ^{34}S y ^{202}Hg para se midieron con un tiempo de integración de 0,1 s utilizando el modo de análisis de tiempo resuelto del instrumento. El tiempo total de adquisición se fijó en 60 segundos. Los datos sin procesar se llevaron a Microsoft Excel para un tratamiento adicional. Las condiciones experimentales empleadas en los análisis de LA-ICP-MS se muestran en la Tabla C.7.

Tabla C.7. Condiciones experimentales del sistema LA-ICP-MS empleadas en este trabajo.

ICP-MS Agilent 7500ce	
Potencia RF	1500 W
Flujo de Ar (plasmógeno)	15 L·min ⁻¹
Flujo de Ar (gas portador)	0.75 L·min ⁻¹
Modo de adquisición	Análisis de tiempo resuelto (TRA)
Puntos por unidad de masa	1
Tiempo de integración	0.1 s
Masas medidas	^{34}S , ^{202}Hg
LA CETAC LSX-213	
Energía del láser (5.6 mJ máx)	20 %
Frecuencia de repetición	10 Hz
Tamaño de punto	50 μm
Modo de ablación	Un solo punto (<i>Single point</i>)
Flujo de He	0.80 L·min ⁻¹

C.1.7. Otra instrumentación

- Sistema de extracción por microondas focalizadas

Se utilizó un sistema de microondas focalizadas Discover (CEM, Matthews, NC, EE.UU.) dotado con un inyector automático Explorer (CEM) en la extracción de las especies de mercurio de las muestras sólidas. Como se puede observar en la Figura C.15, la unidad de microondas empleada en este trabajo incorpora una guía de ondas y una cavidad circular con varios puntos de entrada para las microondas. La temperatura se controló mediante un sensor infrarrojo que monitoriza y controla las condiciones de temperatura del recipiente de reacción ubicado en la cavidad del instrumento, sin introducir una sonda de temperatura dentro de la muestra. Estas características hacen que el sistema sea adecuado para extracciones sólido-líquido en el que se debe garantizar un control preciso y fiable de las condiciones de extracción.

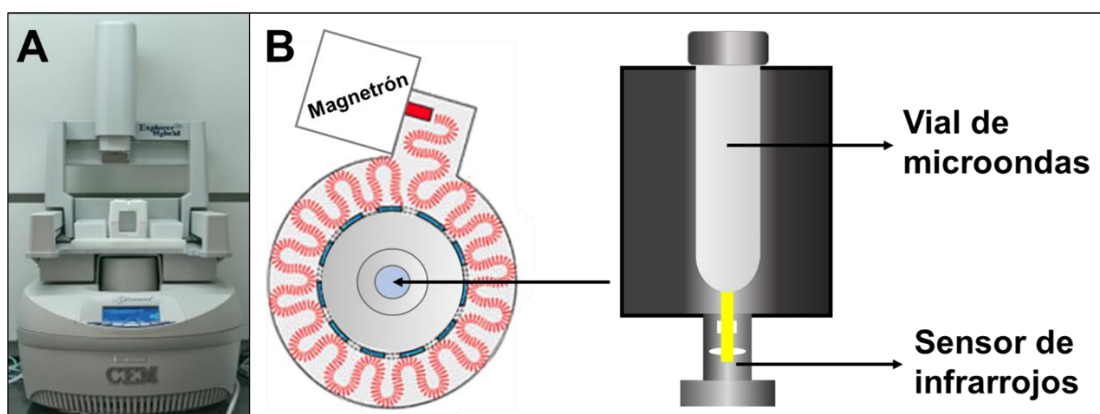


Figura C.15. Imagen del microondas CEM Explorer (A) y esquema de la formación y transmisión de las microondas al vial de muestra (B).

- Balanza analítica Mettler Toledo MS Semi-micro MA.205DU (Barcelona, España)
con una precisión de 0.0001 g.

- pH-metro Basic 20 CRISON pH-meter (Alella, Barcelona, Spain)

- Baño de ultrasonidos (Selecta, Barcelona, España).

- Placa calefactora RCT Basic (IKA, Staufen, Alemania).

- Centrífuga CENTRO-8 BL (JP Selecta, Barcelona, Spain).

- Dispositivo de destilación de ácidos “sub-boiling” de PFA (Savillex, AHF
Analystechnik, Tübingen, Alemania)

- Evaporador Mini-Vap (Supelco, Bellefonte PA)

C.2. Materiales y reactivos

C.2.1. Patrones enriquecidos isotópicamente y de abundancia natural

Para el análisis por dilución isotópica se han empleado disoluciones enriquecidas de Me^{201}Hg , Et^{198}Hg y $^{199}\text{Hg}(\text{II})$, todas ellas adquiridas a ISC-Science (Oviedo, España). Los patrones de abundancia natural que se emplearon en la caracterización de MeHg y $\text{Hg}(\text{II})$ fueron adquiridos a Sigma-Aldrich. En el trabajo de certificación, para la determinación de compuestos de butilestaño se empleó como trazador una mezcla de mono-, di- y tri-butilestaño enriquecidos en ^{119}Sn obtenida de ISC-Science (Oviedo, España). Las diluciones de todos los patrones orgánicos se prepararon utilizando una mezcla 3:1 de ácido acético (Merck) y metanol (Sigma-Aldrich). Los patrones de $^{199}\text{Hg}(\text{II})$ y $^{\text{nat}}\text{Hg}(\text{II})$ se diluyeron en HCl ultrapuro al 2% en agua Milli-Q ($\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Todas las disoluciones se almacenaron a -18°C hasta su utilización, a excepción del $^{199}\text{Hg}(\text{II})$ y $^{\text{nat}}\text{Hg}(\text{II})$ que se almacenaron en nevera. La disolución estándar de referencia de MeHg primaria utilizada en las medidas de CSIA para determinar $\delta^{13}\text{C}$, se preparó a partir de una sal de cloruro de metilmercurio (Sigma-Aldrich), disuelta en 10% (v/v) metanol/agua. En la optimización de los parámetros de PT-GC-IRMS se empleó un patrón de BTEX de Restek (Bellefonte, PA, USA) de $200 \mu\text{g g}^{-1}$ de benceno, etilbenceno, tolueno y (m, o, p) xileno en metanol. Las diluciones se llevaron a cabo en metanol, manteniéndolas almacenadas en nevera, y a partir de ellas se preparó diariamente un estándar secundario de 200 ng g^{-1} en agua Milli-Q ($\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Las soluciones estándar de MeHg y $\text{Hg}(\text{II})$ diluidas se prepararon en HCl ultrapuro al 1% (p/p). En las medidas por GC-IRMS se empleó CO_2 de alta pureza, como gas de referencia, que se obtuvo de Air Products (Toulouse, Francia). Este gas se calibró previamente, mediante inyecciones líquidas con una mezcla de alcanos certificada en $\delta^{13}\text{C}$.

C.2.2. Materiales de referencia

El Material de referencia certificado de sangre **NIST SRM 955c** (*Sangre caprina*) se obtuvo del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Este material consta de 4 niveles de concentración y solo el nivel L3 está certificado en concentraciones de MeHg , EtHg y $\text{Hg}(\text{II})$. Los materiales de pelo humano **IAEA-085** y **IAEA-086** se adquirieron del Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA, Viena, Austria). El material de referencia

certificado **DOLT-4** (*hígado de pez gato*) se adquirió en el NRC (Consejo Nacional de Investigación de Canadá). El **NIST SRM 1974c** (*tejido fresco de mejillón congelado*) para el trabajo de certificación fue proporcionado por el NIST en seis frascos individuales de los cuales uno se rompió durante el transporte y fue desechado para el estudio. Este material se almacenó a -80°C hasta su análisis. Los materiales de referencia certificados en relaciones isotópicas **NIST RM 8610** (nuevo estándar secundario de Hg(II) de Almaden) y **NIST SRM 3133** también fueron adquiridos en el NIST. Estos materiales se diluyeron en HCl ultrapuro al 3% en agua Milli-Q ($\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) y se almacenaron en nevera hasta su utilización. En la calibración previa del CO_2 de referencia empleado en las medidas GC-IRMS se empleó una disolución estándar de mezcla de alcanos C_{15} - C_{13} - C_{20} certificada en $\delta^{13}\text{C}$ (Chiron, Noruega).

C.2.3. Reactivos generales

Las digestiones de las muestras se realizaron con hidróxido de tetrametilamonio al 25% (TMAH) (Sigma-Aldrich). Se preparó un tampón de ácido acético/acetato de sodio (Sigma-Aldrich) en agua Milli-Q ($\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) y se ajustó a pH 4 con HCl ultrapuro al 10% (Sigma-Aldrich) (en el caso de los compuestos de butilestaño, el pH óptimo para la derivatización se fija a 4.9). La propilación y etilación de los compuestos de mercurio se realizó utilizando una solución al 2% (p/v) de tetra-etil- y tetra-propil-borato de sodio en agua Milli-Q ($\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Las disoluciones de estos reactivos se adquieren en LGC-Standards al 20% en THF y son divididas en alícuotas y congeladas a -18°C una vez abiertas, y se diluyen al 2% previamente a la derivatización de la muestra. Se empleó hexano (Sigma-Aldrich) para la extracción de los compuestos de mercurio derivatizados. La limpieza de la fase orgánica, después de la extracción, se realizó con Florisil® (Sigma-Aldrich).

En la medida de $\delta^{13}\text{C}$ del MeHg se empleó tetra-etil borato de sodio de Merseburger Spezialchemikalien (Alemania). Esta disolución requirió de un procedimiento de limpieza previo a su dilución con una extracción líquido-líquido en hexano para eliminar compuestos con contenido de carbono, que podían interferir en las medidas. Posteriormente se realizaron dos diluciones para eliminar completamente el hexano. En este caso la concentración empleada para

el tetra-etil borato era de 0.1 % (p/v) en agua Milli-Q ($\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). El tampón empleado para fijar el pH fue de ácido cítrico/citrato de sodio (Sigma Aldrich) 0.5 M a pH 4.

C.2.4. Material de laboratorio

Las barras de agitación magnética recubiertas con PTFE y los tubos de vidrio empleados para las extracciones de microondas se compraron a CEM Corporation (Matthews, NC, USA). En la elaboración de las columnas de limpieza de la fase orgánica con Florisil, se emplearon pipetas Pasteur de vidrio, taponadas en la punta con una pequeña porción de lana de vidrio a fin de bloquear la salida de la sal. Todo el material de vidrio (viales de 15, 7 y 2 mL de vidrio ámbar y transparente) y los viales de GC con inserto pertenecen a Sigma Aldrich. Micropipetas de volumen ajustable de 2-20 μL , 20-200 μL y de 100-1000 μL (High Tech Lab, Polonia y Eppendorf, Alemania). Las disoluciones para el análisis por PT-GC-IRMS se prepararon en viales de vidrio, con septum y tapones metálicos, especiales para el sistema de purga, adquiridos en Action Europe (Sausheim, Francia). Todo el material de laboratorio de vidrio, nuevo y reutilizado, empleado en las medidas por PT-GC-IRMS, se limpió mediante pirólisis antes de su utilización.

C.2.5. Recogida de muestras reales

Las muestras de pelo analizadas por LA-ICP-MS se recolectaron extrayendo 2-4 pelos de la parte posterior de la cabeza de los trabajadores con la ayuda de pinzas de punta plana de acero inoxidable. Se tomaron muestras de cabello de 5 de las personas que sufrieron de intoxicación aguda por mercurio. Las muestras 1-3 se tomaron el 26/02/2013 mientras que las muestras 4 y 5 fueron recogidas el 12/03/2013. Para el análisis, las muestras de cabello se colocaron en portaobjetos de vidrio (25 x 50 mm) y se fijaron con cinta de doble cara. Las muestras de pelo fueron cortadas cada 4 cm colocadas en los portaobjetos que se situarían en la cámara de ablación láser. La distancia a la raíz se estableció con las coordenadas de cada punto de ablación láser. No se realizó tratamiento previo a estas muestras de pelo.

Los tres tipos de muestra de cada trabajador intoxicado se recogieron en el mismo día de muestreo. En total se realizaron 5 sesiones de muestreo durante el mes de Julio (año 2015). Las muestras de pelo fueron recogidas en el propio laboratorio de la Universidad de Oviedo. El pelo

se cortó a la altura de la raíz en la zona occipital, empleándose para ello 2 tipos de tijeras de acero inoxidable. Una vez recogida la muestra, ésta se guardó en un tubo de polipropileno, introducido a su vez en dos bolsas con cierre tipo zip (PE-LD) para evitar posibles contaminaciones dentro del laboratorio. Debido a que había algunas muestras de pelo de más de 10 cm, éstas se cortaron en dos secciones para que tuviesen entre 3-5 cm de largo desde la raíz, como se muestra en la Figura C.16. Antes de ser analizadas, las muestras de pelo se cortaron finamente con las tijeras, para facilitar su homogeneización y digestión.



Figura C.16. Imagen de una porción de pelo dividida en segmentos de entre 3-4 cm.

Las muestras de sangre fueron extraídas en el *Laboratorio de Análisis Echevarne* y suministradas a nuestro laboratorio por su personal, debidamente refrigeradas y aisladas. Una vez recibidas, se almacenaron a -20°C hasta su análisis. Las muestras de orina se recogieron en tubos de polipropileno, e inmediatamente después de su recogida se dividieron en alícuotas en viales con 0,5 mL de muestra cada uno y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. En el caso de las muestras de orina empleadas en la validación de la metodología de dilución isotópica con trazador triple, éstas se obtuvieron de un individuo sin exposición conocida a compuestos de mercurio, para garantizar un nivel de fondo en la orina lo más bajo posible.

C.3. Preparación de muestras

C.3.1. Procedimiento de preparación de muestras para análisis por IDMS

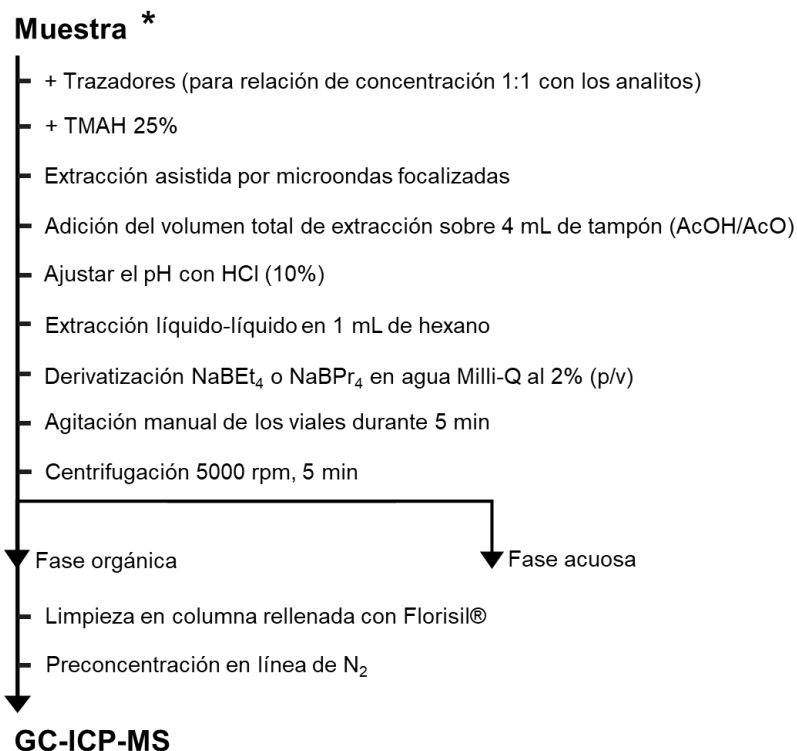
La muestra se pesa directamente en un recipiente de vidrio para microondas de 10 mL y a continuación se añaden las cantidades adecuadas de $^{201}\text{MeHg}$, $^{198}\text{EtHg}$ y $^{199}\text{Hg(II)}$ de tal manera que la relación de cantidades de compuesto natural y enriquecido isotópicamente en la mezcla sea próxima a 1:1 (entre 0.1 and 10 se obtendrán resultados de calidad). En la Tabla C.8 están detalladas las cantidades y los trazadores en función del tipo de muestra y del tipo de análisis por IDMS.

Tabla C.8. Cantidad de muestra según el material empleado, trazadores y condiciones de extracción y derivatización.

Muestra	Cantidad de muestra	Material	Trazadores	Derivatización	Modo de extracción	Programa de extracción
Sangre de cabra	0.5 g	SRM 955c	$^{201}\text{MeHg}$, $^{198}\text{EtHg}$ y $^{199}\text{Hg(II)}$	NaBPr_4 2%, pH 4	Microondas	TMAH 35W 4.5 min
Sangre humana	0.15 g	Muestra real IAEA-085	$^{201}\text{MeHg}$, $^{198}\text{EtHg}$ y $^{199}\text{Hg(II)}$	NaBPr_4 2%, pH 4	Microondas	TMAH 35W 4.5 min
Pelo humano	0.1 g	IAEA-086 Muestra real	$^{201}\text{MeHg}$, $^{198}\text{EtHg}$ y $^{199}\text{Hg(II)}$	NaBPr_4 2%, pH 4	Microondas	TMAH 35W 4.5 min
Orina humana	0.5 g	Muestra real	$^{201}\text{MeHg}$, $^{198}\text{EtHg}$ y $^{199}\text{Hg(II)}$	NaBPr_4 2%, pH 4	Microondas	TMAH 35W 4.5 min
Hígado de pez perro	0.15 g	DOLT-4	$^{201}\text{MeHg}$ y $^{199}\text{Hg(II)}$	NaBEt_4 2%, pH 4	Microondas	TMAH 70°C 4 min
Tejido de mejillón	0.15 g	SRM 1974c (para butilestaño)	$^{201}\text{MeHg}$ y $^{199}\text{Hg(II)}$ ^{119}MBT , ^{119}DBT y ^{119}TBT	NaBEt_4 2%, pH 4.9	Baño termostático AcOH/MeOH 3:1	37°C 2h

A continuación, se añade un volumen de 4 ml de TMAH al 25%, se cierra el vial y se coloca en el equipo de microondas focalizado. La extracción asistida por microondas se realiza a una potencia fija de 35 W durante 4,5 min, tal como se describe en una publicación anterior.²⁷⁸ Después de la digestión de la muestra, todo el extracto se transfiere a un vial de vidrio en el que se han añadido previamente 4 mL de tampón de ácido acético/acetato de sodio (pH 4). El pH se reajusta a 4 añadiendo unas gotas de HCl sub-boiling concentrado. Para la derivatización, se añaden 0,2-0.6 mL de una disolución de tetra n-propilborato de sodio en agua Milli-Q al 2% (p/v) y 1 ml de hexano para la extracción líquido-líquido. La derivatización y extracción en hexano se realiza mediante agitación manual durante cinco minutos. Tras la extracción la muestra se

centrifuga durante 5 min a 5000 rpm para separar las fases. Una vez separadas, la fase orgánica se limpia utilizando columnas de Florisil.²⁷⁹ Finalmente, la mayoría de la fase orgánica se transfiere a un vial de vidrio transparente de 2 ml y se almacena a -18 °C hasta su análisis. Justo antes de la inyección en el sistema GC-ICP-MS, las muestras se preconcentran bajo una corriente suave de nitrógeno en una unidad de evaporación Minivap, hasta un volumen final aproximado de 10 µL. La Figura C.17 muestra un esquema del procedimiento de preparación de la muestra descrito anteriormente. También se han preparado blancos de procedimiento, para determinar posibles impurezas de Hg contenidas en los diferentes reactivos. En este caso se ha seguido el mismo procedimiento sin adicionar la muestra. La optimización de los parámetros en la certificación del material NIST SRM 1974c, condujo al empleo de programas de microondas a T constante para la digestión de los materiales de pescado (DOLT-4) y mejillón (SRM 1974c). En este caso el programa óptimo fue de 70°C durante 4 min, siguiendo el protocolo de Castillo *et al.* (2010).¹⁹⁹ En este caso se seleccionaron 0.15 g del material. Para los compuestos de butilestaño la digestión se realizó en una mezcla de ácido acético/metanol 3:1, en un baño de agua con control de temperatura a 37°C durante 2h.



* Las diferencias en la preparación de muestras y las cantidades añadidas en función de la matriz se han presentado previamente en la Tabla C.8

Figura C.17. Procedimiento de preparación de muestras para cuantificación por IDMS.

C.3.2. Preparación de muestras para medidas de relaciones isotópicas.

C.3.2.1. Muestras para medidas de valores δHg

Las disoluciones de trabajo de Hg(II) se prepararon a partir de los materiales NIST SRM 3133 y NIST RM 8610. Para ello se partió de una disolución de $10 \mu\text{g (Hg) g}^{-1}$, y se añadieron únicamente 0.025 g sobre 4 mL de tampón de ácido acético/acetato (0.1M , $\text{pH } 4$). De este modo la concentración final en la fase orgánica sería de $250 \text{ ng (de Hg) g}^{-1}$. El volumen añadido es lo más bajo posible para evitar un desajuste del pH , que pueda provocar cualquier transformación, debido a que el estándar se encuentra diluido en $\text{HCl } 2\%$. El Hg(II) se etiló y se extrajo en una fase orgánica mediante la adición de 1 ml de hexano y $0,200 \text{ ml}$ de tetraetil borato de sodio al 2% , seguido de 5 minutos de agitación manual. Finalmente, la fase orgánica se transfirió a un vial de vidrio de 2 ml y se almacenó a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis. En todo momento a lo largo de la sesión analítica, el vial conteniendo la muestra se mantiene en un recipiente a baja temperatura para minimizar su degradación y por tanto las posibles variaciones en la composición isotópica. Asimismo, se agregó MeHg en el caso de la optimización de parámetros cromatográficos.

C.3.2.1. Muestras para medidas de $\delta^{13}\text{C}$

Las disoluciones para PT-GC-IRMS se preparan con la adición de entre $50\text{-}200 \mu\text{l}$ de la solución estándar en un volumen final de 10 ml con Milli-Q, en viales empleados en el sistema de PT. Las disoluciones de Hg(II) y MeHg consistieron en la adición de $25\text{-}200 \mu\text{L}$ de estas soluciones estándar de $1 \mu\text{g g}^{-1}$, 1 ml de tampón de ácido cítrico/citrato de sodio (0.5M $\text{pH } 4$) y $100 \mu\text{L}$ de tetra etilborato 0.1% en agua. En la optimización de la derivatización se han empleado entre $50\text{-}250 \mu\text{L}$ de NaBEt_4 0.1% en agua Milli-Q. El volumen final de la solución es 10 mL con Milli-Q, cantidad necesaria para una purga eficiente de la disolución. La sal de NaBEt_4 presenta algunas impurezas con contenido de carbono que interfieren en la medida de las especies etiladas de Hg. Debido a esto se realiza un proceso previo de limpieza de esta disolución a través de una extracción líquido líquido con hexano. La sal de tetraetilborato de sodio (NaBEt_4) se diluyó al 2% en Milli-Q, se dividió en alícuotas en viales de 1 ml y se almacenó en el congelador a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. La solución se limpió, antes de su dilución al $0,1\%$, por medio de una extracción

Experimental

líquido-líquido con hexano y dos diluciones posteriores para eliminar las trazas de hexano en el reactivo. Este paso de limpieza permite eliminar algunas sustancias orgánicas interferentes. Este procedimiento se realiza justo antes de la preparación de las soluciones para el análisis, con partes alícuotas congeladas almacenadas del reactivo que deben fundirse antes de la limpieza con hexano. En la Figura C.18 se muestra un esquema de la preparación de las disoluciones de BTEX y MeHg y Hg(II) para su análisis por PT-GC-C-IRMS. Se emplearon diluciones de BTEX de esta solución estándar en MeOH y, finalmente, en Milli-Q, en este trabajo. Las soluciones para PT-GC-IRMS se preparan con la adición de 50-200 μl de la solución estándar en un volumen final de 10 ml con Milli-Q, en los mismos viales descritos para las soluciones estándar de Hg.

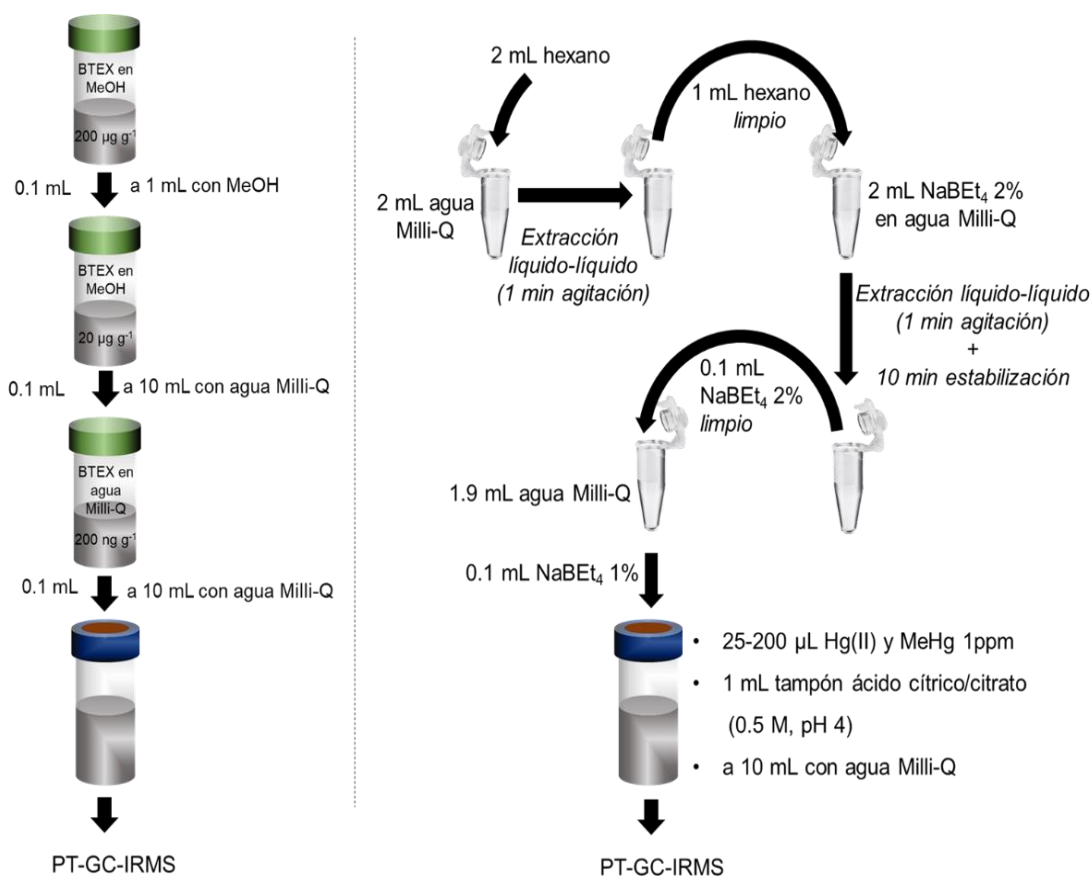


Figura C.18. Preparación de los patrones de BTEX (A) y compuestos de Hg (B) para su análisis por PT-GC-IRMS

C.3.3. Preparación de muestras de pelo para ablación láser

Las muestras de pelo se fijaron sobre portas de vidrio de 50 x 24 mm utilizando cinta adhesiva por las dos caras. Dado que la longitud del pelo era mayor que la longitud del porta, se cortó el pelo en varios trozos que se colocaron de forma paralela sobre la cinta adhesiva, como se muestra en la Figura C.19. Este tamaño es el máximo posible de la muestra para el sistema de ablación láser empleado. Primero se fijó la cinta adhesiva sobre el porta de vidrio y posteriormente se fijó el pelo sobre la cinta adhesiva. La Figura C.19 muestra la colocación de los pelos 1, 2, 3, 4 y 5. Se utilizó una regla metálica colocada sobre el porta de vidrio para calcular aproximadamente el tamaño del pelo. La longitud total del pelo1 fue de unos 71 mm, la del pelo2 fue de 50 mm, la del pelo4 unos 67 cm y la del pelo5 200 cm respectivamente. La raíz del pelo aparece a la izquierda de las imágenes en el trozo más largo de pelo. La punta del pelo aparece a la derecha de las imágenes en el trozo más corto de pelo. Las imágenes aparecen un poco distorsionadas ya que fueron tomadas con el propio sistema de ablación láser a partir de 96 imágenes parciales superpuestas.

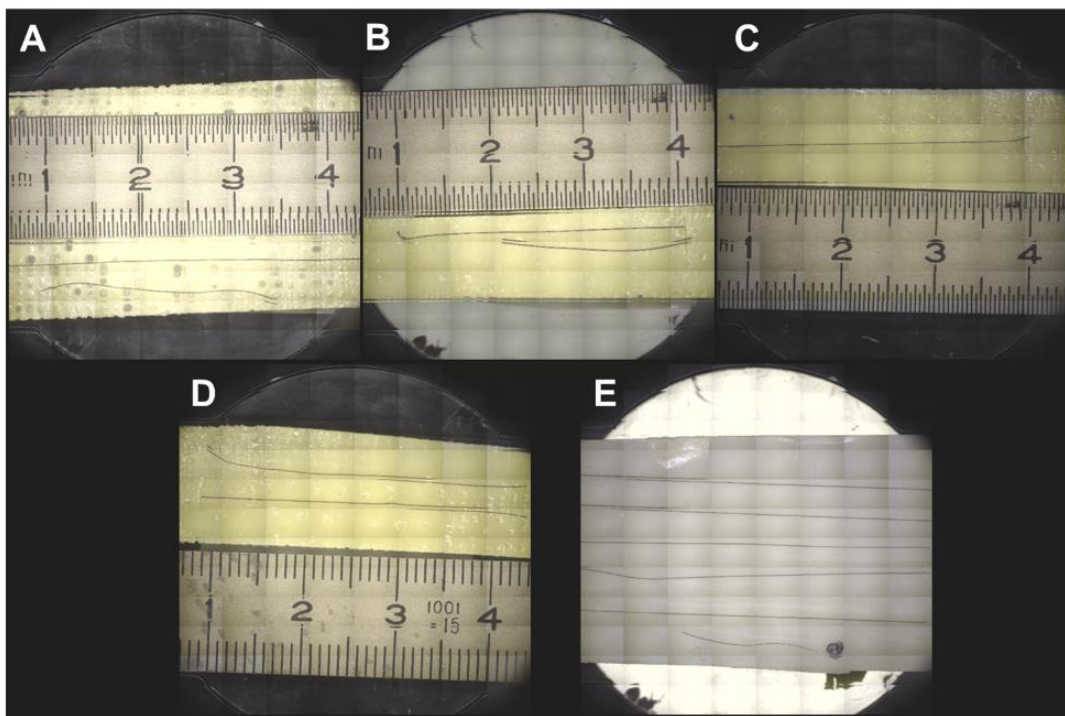


Figura C.19. Muestras de pelo 1 (A),2 (B),3 (C), 4 (D) y 5(E) situadas sobre portas de vidrio y medidas por LA-ICPMS en este trabajo.

C.3.4. Digestión de muestras de pelo tras ablación láser

El análisis de especiación de las muestras de pelo requiere la extracción previa. Ante la imposibilidad de separar el pelo del soporte, se optó por recortar la porción mínima de soporte que contenía los fragmentos de pelo de modo que se digirió junto con el pelo parte del material del porta y de la cinta adhesiva empleada.

Las muestras en las que se incluía el pelo, parte de la cinta adhesiva y del porta de vidrio se extrajeron con una disolución de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) al 25% en agua. Además, se realizaron dos blancos del procedimiento para garantizar que no existía contribución de mercurio procedente tanto del porta de vidrio como de la cinta adhesiva empleada. A partir de aquí el procedimiento llevado a cabo es el equivalente al llevado a cabo en las muestras cuantificadas por IDMS. A su vez se ha llevado a la digestión de una muestra de pelo de un individuo no expuesto ocupacionalmente a Hg para realizar una comparativa entre las proporciones de las especies. En la Figura C.20 se muestra la porción de soporte donde se encontraba el pelo, que se sometió a extracción antes y después del proceso de microondas focalizadas.

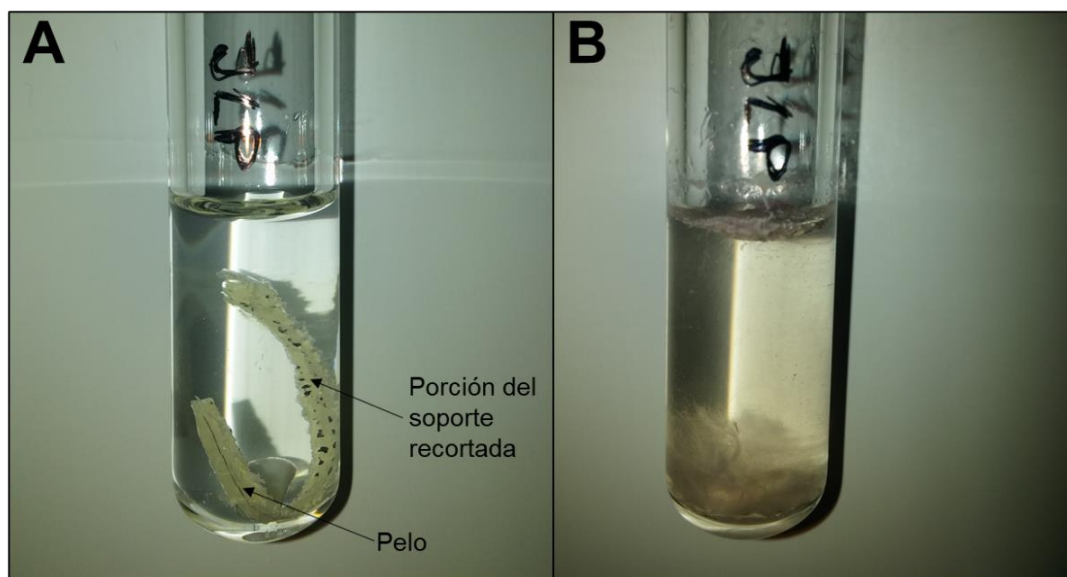


Figura C.20. Imagen de las muestras del porta de vidrio y la cinta adhesiva recortadas conteniendo los fragmentos de pelo, antes (A) y después (B) de la extracción en microondas.

C.4. Especiación de Hg por IDMS con múltiples trazadores

C.4.1 Medida de las abundancias isotópicas por GC-ICP-Q-MS

El análisis de especiación de Hg por GC-ICP-MS se llevó a cabo a través de la medida de los isótopos 198, 199, 200, 201 y 202. El analizador de masas se encuentra configurado para realizar barridos de 5 relaciones m/z correspondientes a dichos isótopos. En algunos de los ensayos se midieron también los isótopos 196 y 204 de Hg. El modo de adquisición fue el Análisis de tiempo resuelto (TRA), que permite monitorizar las masas señaladas a lo largo del tiempo de adquisición, que es el modo óptimo de trabajo para obtener picos cromatográficos. Para este propósito se empleó, un tiempo de integración por masa de 0.08 s, que fue suficiente para poder seguir con precisión el perfil de pico cromatográfico y evitar el desplazamiento espectral. Los voltajes de las lentes en el sistema GC-ICP-MS, se optimizan al comienzo de cada sesión de medida, utilizando la señal de los dímeros del Argon: $^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ and $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$. El resto de los parámetros deben ser optimizados previamente, mediante la introducción de una disolución de tuning por nebulización convencional. El tiempo de integración por isótopo para la medida de especies de Sn fue de 40 ms y los isótopos medidos fueron 116, 117, 118, 119 y 120. La integración de los picos cromatográficos se realizó con el programa suministrado con el equipo ICP-MS (Chromatographic Data Analysis del software Chemstation de Agilent). Las relaciones isotópicas se computan como relaciones entre áreas de pico. Todas las muestras se inyectaron por triplicado en el sistema GC-ICP-MS con el fin de obtener la incertidumbre instrumental y de integración.

C.4.2. Caracterización de disoluciones enriquecidas

El análisis por dilución isotópica requiere el conocimiento previo de la concentración, impurezas y abundancias isotópicas del trazador o trazadores enriquecidos. La caracterización de los trazadores en concentración se realiza mediante dilución isotópica inversa. Para ello se considera el trazador como la especie a determinar, y emplear un trazador de concentración y abundancias conocidas en su determinación.

Los trazadores caracterizados en este trabajo fueron las especies Me^{201}Hg , Et^{198}Hg y $^{199}\text{Hg}(\text{II})$. Las abundancias isotópicas deben determinarse experimentalmente a través de las áreas de pico por GC-ICP-MS obtenidas en una dilución del patrón. La cuantificación de las disoluciones $^{199}\text{Hg}(\text{II})$ y $^{201}\text{MeHg}$ fue realizada mediante IDMS inversa usando patrones de MeHg y Hg(II) de abundancia isotópica natural. En el caso del Et^{198}Hg se empleó una estrategia diferente debido a la falta de un patrón certificado de EtHg de abundancia isotópica natural en el mercado nacional e internacional. En primer lugar, se determinó el Hg total de la disolución de $^{198}\text{EtHg}$ mediante IDMS inversa y Neb-ICP-MS utilizando $^{199}\text{Hg}(\text{II})$ (previamente caracterizado) como trazador. En segundo lugar, las impurezas de MeHg y Hg(II) presentes en la disolución de $^{198}\text{EtHg}$ se determinaron por IDMS GC-ICP-MS utilizando $^{201}\text{MeHg}$ y $^{199}\text{Hg}(\text{II})$ como trazadores isotópicos. Los valores de dichas impurezas se restan del valor al valor de HgT obtenido mediante nebulización convencional ICP-MS, se obtiene la concentración exacta de $^{198}\text{EtHg}$. Para ello es necesario asumir que al HgT en la disolución de $^{198}\text{EtHg}$ sólo contribuyen las especies de Hg(II), MeHg y EtHg. Para ser empleado en este procedimiento, la caracterización previa del $^{199}\text{Hg}(\text{II})$ por GC-ICP-MS fue validada por GC-EI-MS. La Figura C.21 muestra que ambas técnicas proporcionan los mismos valores tanto para la concentración como para la composición isotópica de la solución de $^{199}\text{Hg}(\text{II})$.

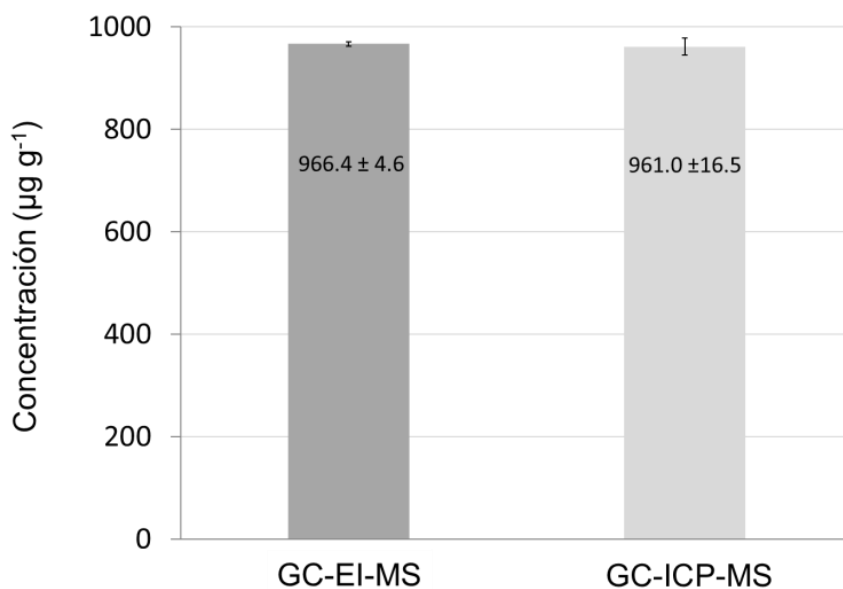


Figura C.21. Concentración obtenida para el trazador $^{199}\text{Hg}(\text{II})$ por GC-EI-MS y GC-ICP-MS.

C.4.3. Cálculo matemático para IDMS con trazador triple

Como se ha explicado previamente las medidas por GC-ICP-MS se han llevado a cabo en una mezcla de la muestra, con las especies de abundancia isotópica natural, y los trazadores de abundancias isotópicas enriquecidas. Una vez que los trazadores isotópicos se añaden a la muestra y que las reacciones de interconversión han tenido lugar, se pueden establecer balances de masas para las especies de Hg teniendo en cuenta las posibles impurezas en cada una de las disoluciones de trazador. Si consideramos un sistema de tres especies de mercurio que se transforman como se describe en la Figura C.22, podemos definir seis factores de interconversión de F1 a F6.

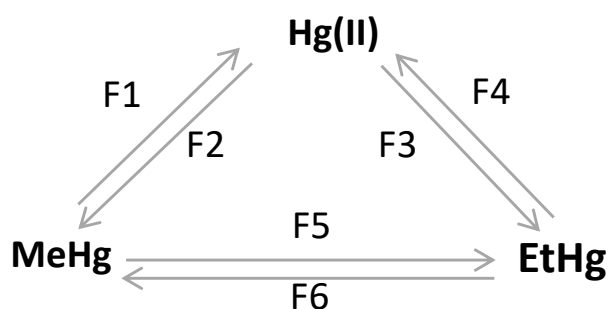


Figura C.22. Representación de las seis reacciones de interconversión que pueden sufrir el MeHg, EtHg y el Hg(II) durante su análisis.

Debido a su alta volatilidad y la ausencia de un análogo isotópicamente enriquecido, el Hg(0) no se consideró en este modelo. A pesar de que las transformaciones a Hg(0) no pueden cuantificarse, sí se corrigen las pérdidas dentro del sistema por degradación a este compuesto dado que esta transformación no es reversible. Para el cálculo se hace uso de la Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD). Por tanto, se asume que la composición isotópica de la mezcla de abundancia natural y compuestos marcados es una combinación lineal de los patrones de isótopos de los diferentes constituyentes de la mezcla. De este modo, para cada uno de los picos cromatográficos se obtiene una matriz similar a la obtenida en la ecuación C.1.

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

De acuerdo a esta ecuación la fracción molar de compuesto de abundancia natural y compuesto enriquecido isotópicamente se puede calcular a partir de los espectros de masas experimentales y de las abundancias isotópicas individuales de cada uno de los constituyentes. Las soluciones a los tres sistemas de ecuaciones son doce fracciones molares (cuatro para cada sistema) correspondientes a las especies de Hg naturales y marcadas en cada pico cromatográfico. Aplicando a estos perfiles isotópicos la regresión lineal múltiple (en Microsoft Excel como se muestra en la Figura C.23. para el Hg(II)), obtenemos directamente dichas fracciones molares. Como la relación de fracciones molares es igual a la relación de moles, conociendo la cantidad inicial de compuesto enriquecido añadido a la muestra, los moles de compuesto de abundancia natural pueden obtenerse directamente.

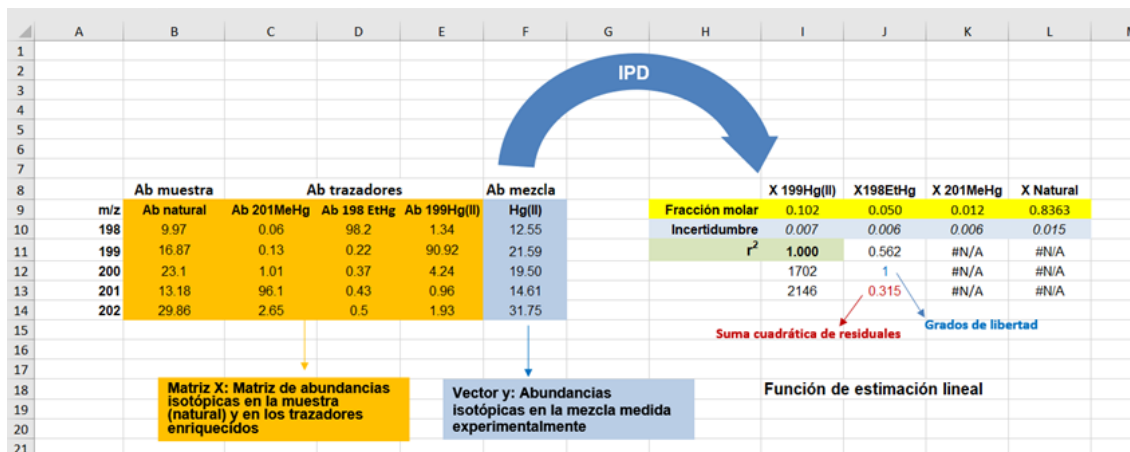


Figura C.23. Cálculo de las fracciones molares para el pico de Hg(II) por IPD a partir de la función Estimación Lineal en Microsoft Excel.

A continuación, se desarrollará otra matriz similar de ecuaciones de donde se extraerán los factores de transformación entre especies, que servirán para realizar la corrección. Y finalmente se extraerá el número de moles de cada especie corregidos. Más detalles sobre el procedimiento de cálculo y sobre el desarrollo de las ecuaciones matemáticas se dan en la

Sección D.1. Estas ecuaciones están basadas en las desarrolladas previamente para un trazador isotópico doble,¹⁵¹ las cuales fueron empleadas en la certificación del material SRM 1974c para la especiación de MeHg y Hg(II), y que han sido presentadas en la Sección A.4 de esta tesis doctoral. En este caso el cálculo se realiza de la misma forma, pero solo para las especies de MeHg y Hg(II).

C.4.4. Corrección de la discriminación de masas

La discriminación de masas que se produce en la fuente de ICP puede corregirse mediante diferentes modelos, que se han explicado en la sección A.2. En este caso se va a detallar el procedimiento de corrección llevado a cabo para IDMS, cumpliendo los requisitos de las medidas a realizar. La corrección de la discriminación de masas se realizó utilizando una corrección interna basada en la minimización de la suma cuadrática de los residuales entre las abundancias isotópicas experimentales y calculadas de la muestra. De esta forma, suponiendo que la discriminación de masas es el único factor que no se controla, causando el error en la relación isotópica, podemos obtener internamente para cada inyección un factor de discriminación de masas minimizando iterativamente la suma cuadrática total de residuales en la suma de las tres regresiones lineales múltiples realizadas para cada especie de Hg. Debido a que se realizan los cálculos mediante regresión lineal múltiple, obtenemos unos residuales de la regresión, que pueden ser minimizados mediante la variación de un factor, conocido como factor de discriminación de masas. El programa Microsoft Excel tiene la posibilidad de añadir una extensión denominada Solver que realiza este procedimiento de minimización iterativa de residuales. Una vez que se obtiene el factor de discriminación de masas hay que seleccionar el modelo de corrección. En el caso de la cuantificación de especies de Hg a través de ICP-MS, hemos seleccionado el modelo de corrección lineal, correspondiente a la Ecuación C.2.

$$R_{corr} = \frac{R_{exp}}{1+K \times \Delta M} \quad Ec. C.2$$

Este cálculo proporciona una corrección de la discriminación de masas sin llevar a cabo la medida de las relaciones de isótopos adicionales, tales como procedimientos externos basados en el “*bracketing*” de patrones naturales entre las muestras o procedimientos internos basados en la introducción simultánea de una serie de elementos naturales o especies durante la separación cromatográfica. Más detalles sobre este procedimiento se pueden encontrar en una publicación previa.²⁸⁰

C.4.5. Cálculo de concentraciones de butilestaño por dilución isotópica

Como se ha comentado previamente, la certificación del material de referencia por dilución isotópica para Hg también conllevó la cuantificación de las especies de butilestaño presentes. En este caso la cuantificación se llevó a cabo por dilución isotópica sencilla específica de las especies. Se ha demostrado en trabajos previos que no se produce interconversión de las especies en las condiciones de trabajo aquí empleadas²⁰⁸. Por lo tanto, se ha aplicado directamente la ecuación de la dilución isotópica empleando un trazador mixto de los tres compuestos enriquecido en el isótopo ¹¹⁹Sn, expresada en función de la relación de fracciones molares en la Ecuación C.3.

$$C_{nat} = C_{119} \cdot \frac{m_{119}}{m_{nat}} \cdot \frac{M_{nat}}{M_{119}} \cdot \frac{X_{nat}}{X_{119}} \quad \text{Ec. C.3.}$$

donde m_{nat} y m_{119} son los pesos de muestra y trazador respectivamente. M_{nat} y M_{119} son los pesos atómicos del Sn en la muestra de abundancia natural y el trazador enriquecido en ¹¹⁹Sn. Las fracciones molares X_{nat} y X_{119} se extraen mediante IPD a partir de las abundancias de ^{nat}Sn y ¹¹⁹Sn extraídas de las áreas de pico medidas experimentalmente, para cada compuesto.

C.5. Determinación de relaciones isotópicas de Hg

C.5.1. Medida de las abundancias isotópicas por GC-MC-ICP-MS

En este trabajo se miden los isótopos ^{198}Hg , ^{199}Hg , ^{200}Hg , ^{201}Hg , ^{202}Hg , ^{203}Tl y ^{205}Tl , detectados simultáneamente en las copas de Faraday L3, L2, L1, C, H1, H2 y H3, respectivamente. Debido a limitaciones técnicas en la posición de las copas, no realizamos la medición de los isótopos ^{204}Hg y ^{196}Hg . Los dos isótopos de Tl se midieron para llevar a cabo la corrección de la discriminación de masas en una introducción continua por nebulización. Se optimizaron cuatro tiempos de integración para la mejora de la precisión (0.131, 0.262, 0.524, 1.049 segundos). Para los tiempos de integración más cortos (0.13 y 0.26 s) es posible realizar medidas en picos estrechos con una elución rápida de 6.75 min para los compuestos MeHg y Hg(II). Sin embargo, los tiempos de integración más largos requieren que la medida se realice en picos anchos, con suficientes datos para obtener mediciones de alta precisión.

El protocolo de optimización MC-ICP-MS antes de la medida requiere diferentes pasos: (i) cargar de la configuración de copas Faraday para establecer las copas en sus posiciones óptimas, (ii) obtener la calibración de los amplificadores Faraday de acuerdo con las indicaciones del fabricante para la mejora de la reproducibilidad, (iii) ajustar la ventana de masa para los isótopos medidos centrando las masas para la colección ajustando la ventana de masa para ^{205}Tl , (iv) optimización de las lentes ópticas y la posición de la antorcha para la mejor transmisión de los iones mediados por la introducción de Tl, (v) optimización de los flujos de Ar para la máxima señal de Tl mediante la modificación de los flujos Ar. El estudio de la señal de Tl y Hg según los flujos de trabajo Ar se describe en la Sección D.3. Todos estos parámetros se optimizan con la nebulización de una solución de Tl de 20 ng g^{-1} en HCl 3%.

C.5.2 Cálculo de valores delta de Hg ($\delta^{xxx}\text{Hg}$ y $\Delta^{xxx}\text{Hg}$)

El protocolo de determinación de los valores de delta se lleva a cabo con las siguientes etapas: (i) medida de las intensidades de los estándares y la muestra, (ii) corrección de las intensidades para el desfase temporal en las copas de Faraday, (iii) cálculo de las relaciones

isotópicas a partir de las señales corregidas, (iv) corrección de la relación isotópica por el error en la discriminación de masas en la interfase ICP-MS, (iv) cálculo de los valores $\delta^{xxx}\text{Hg}$ y $\Delta^{xxx}\text{Hg}$ para los isótopos 199, 200, 202 y 201 respecto al 198, a partir de las relaciones isotópicas de muestra y estándares de referencia.

C.5.3.1 Corrección del desfase temporal entre copas de Faraday

El desfase temporal entre los amplificadores de las copas de Faraday es una fuente de incertidumbre en las relaciones isotópicas cuando se miden señales transientes. La corrección de las intensidades para el desfase temporal entre copas de Faraday se ha llevado a cabo para los métodos de cálculo LRS y PbP descritos más abajo. El modelo para la corrección del desfase temporal se basa en el supuesto de que la copa de Faraday L3 ($m/z = 198$) registra la señal correcta, mientras que las otras cuatro (L2, L1, C y H1) se retrasan con respecto a ella.¹⁶² La Figura C.24 representa el modelo de corrección empleado. Dado que el desfase temporal afecta principalmente a la medida de señales transientes, que presentan cambios bruscos en la intensidad, no se tienen en cuenta las copas H2 y H3 que llevaron a cabo la detección de la señal continua de los isótopos de Tl.

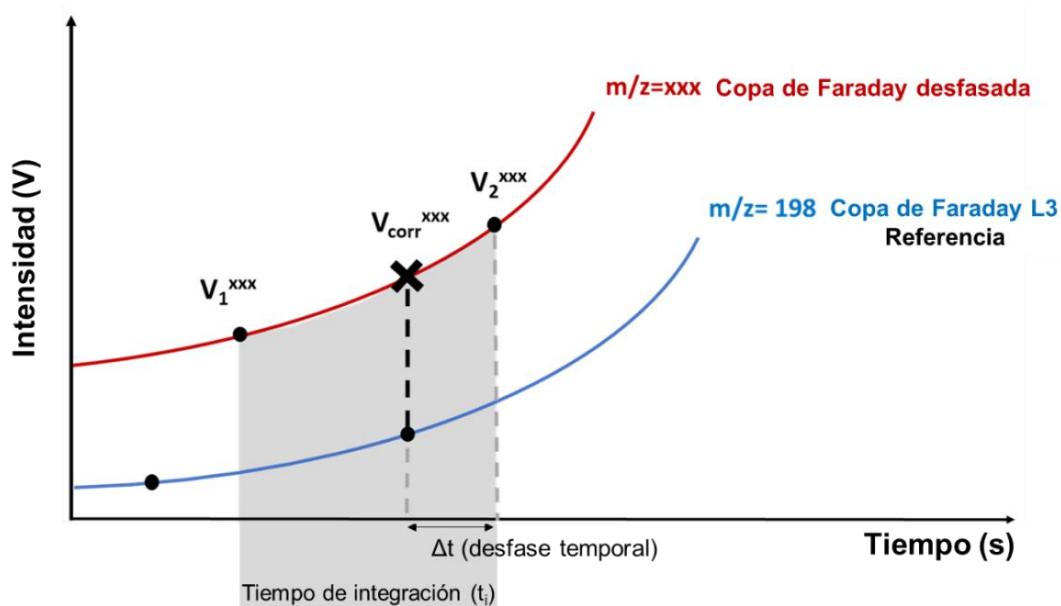


Figura C.24. Representación esquemática del desfase temporal entre copas de Faraday

De este modo, variación de la señal durante el intervalo del desfase temporal, es lineal y proporcional a la variación durante el tiempo de integración entre dos medidas de un mismo isótopo. La ecuación se podría representar como:

$$\frac{\Delta V}{\Delta t_i} = \frac{\Delta V}{\Delta t} \quad \text{Ec. C.4}$$

donde Δt_i es el tiempo de integración asignado en la medida de las relaciones isotópicas y Δt es el desfase temporal entre la copa de Faraday correspondiente y la copa L3 que detecta la relación m/z 198. A partir del esquema de la Figura C.24, la ecuación C.4 puede transformarse de la siguiente forma:

$$\frac{V_2^{xxx} - V_1^{xxx}}{\Delta t_i} = \frac{V_2^{xxx} - V_{corr}^{xxx}}{\Delta t} \quad \text{Ec. C.5}$$

El desarrollo de esta ecuación da como resultado la siguiente ecuación para las intensidades corregidas:

$$V_{corr}^{xxx} = V_2^{xxx} - \frac{\Delta t}{\Delta t_i} \cdot (V_2^{xxx} - V_1^{xxx}) \quad \text{Ec. C.6}$$

En estas ecuaciones, V_1 y V_2 son los voltajes medidos para el isótopo xxx por la copa retardada al principio y al final del tiempo de integración (Δt_i). El cálculo de V_{corr} por la ecuación C.6 requiere el cálculo previo del intervalo de tiempo (Δt) para cada copa. En este trabajo, hemos calculado el desfase temporal para cada copa minimizando la suma cuadrática de los residuales de la regresión lineal aplicada para calcular la relación de isótopos. Otros modelos han reportado algunas posibilidades de corrección del desfase temporal para el método LRS: minimizando la pendiente, la RSD de la pendiente o maximizando el coeficiente de regresión lineal r^2 .^{162,281} La minimización de los residuales conduce directamente a la minimización del error estándar de la pendiente o la maximización del de la regresión lineal. Esto se realiza a partir de la función Solver en Microsoft Excel evitando la restricción para variables negativas. En el caso del método PbP, el valor de Δt se puede obtener de forma iterativa minimizando el error estándar de la media.

C.5.3.2. Cálculo de relaciones isotópicas

Para el cálculo de la relación isotópica en las señales transientes, a través de las intensidades medidas por GC MC-ICP-MS y corregidas para el desfase temporal entre copas de Faraday, se han empleado tres métodos diferentes: pendiente de la regresión lineal (LRS), punto a punto (PbP) e integración de área de pico (PAI). El método de Promedio de la Relación Isotópica²⁸² no se ha considerado en este trabajo debido a que presenta características similares al método de la pendiente de la regresión lineal (LRS).

➤ **Método de la pendiente de regresión lineal (LRS)**

El método de la pendiente de regresión lineal (LRS) consiste en trazar las constantes de los dos isótopos involucrados en la relación de isótopos.^{158,283} Los datos se ajustan por aproximación de mínimos cuadrados a una línea que corresponde a:

$$V^{xxx} = V^{198} \cdot b + a \quad \text{Ec. C.7}$$

Donde V^{xxx} y V^{198} corresponden a las intensidades del isótopo de interés con respecto a ^{198}Hg . El término a corresponde a la ordenada en el origen de la línea de regresión, mientras que b es la pendiente y la relación isotópica correspondiente entre los isótopos xxx y 198 de Hg. La representación de este cálculo se muestra en la Figura C.25.

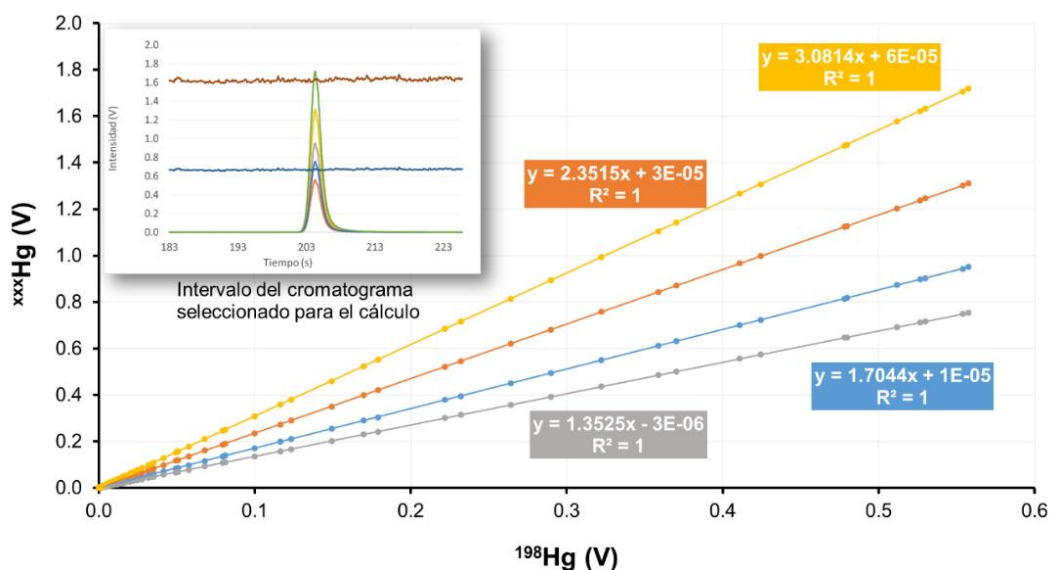


Figura C.25. Representación de un diagrama de dispersión de intensidades ^{xxx}Hg vs. ^{198}Hg , donde la pendiente de la recta b representa la relación isotópica xxx/198.

Los picos cromatográficos generalmente tienen entre 20-40 puntos medidos en el pico. Por lo tanto, si seleccionamos una mayor cantidad de puntos, estamos tomando puntos de la línea de base en el cálculo. Esto significa que tenemos la ordenada en el origen a mejor definida por estos puntos adicionales. Sin embargo, en el caso de seleccionar solo unos pocos puntos en el pico o, como ocurre con la señal continua del TI, es necesario definir el origen para el cálculo del LRS. Para hacer esto, en lugar de ajustar por mínimos cuadrados a una línea de tendencia de tipo $y = bx + a$ (restringido a un valor lógico "constante=1" en la función de Excel), se ajustaría a una línea $y = bx$ (restringido a un valor "constante=0" en la función de Excel).

$$V^{xxx} = V^{198} \cdot b \quad \text{Ec. C.8}$$

Además de la pendiente, la incertidumbre obtenida por este cálculo es el error estándar de la pendiente, expresado de la siguiente manera:

$$u_{LRS} = \frac{\sqrt{\frac{\sum (V_{xxx_i} - \hat{V}_{xxx_i})^2}{n-2}}}{\sqrt{\sum (V_{198_i} - \bar{V}_{198})^2}} \quad \text{Ec. C.9}$$

donde \hat{V}_{xxx_i} representa las intensidades pronosticadas obtenidas mediante la aplicación de la ecuación de la línea de ajuste y el término $(V_{xxx_i} - \hat{V}_{xxx_i})$ corresponde a los residuales de la regresión lineal para el cálculo de las relaciones de isótopos de las intensidades medidas (V) de ^{xxx}Hg con respecto a ^{198}Hg . El término $(n - 2)$ corresponde a los grados de libertad y n es el número de datos utilizados para definir la línea de regresión. En el denominador, V_{198_i} y \bar{V}_{198} son las intensidades individuales y medias del isótopo medido ^{198}Hg . El cálculo de la pendiente de la regresión lineal se puede hacer a través de la función Estimación Lineal en Excel, como se muestra a modo de ejemplo en la Figura C.26. A partir de esta función se obtiene directamente el valor de la incertidumbre asociado a esa pendiente.

		202Hg/198Hg		Vector X	Vector Y
Relación isotópica		3.0814	0.0001	Intensidades ¹⁹⁸ Hg	Intensidades ²⁰² Hg
Incertidumbre		0.0002	0.0000		
r ²		1.000	0.000		
		311303759	319	Grados de libertad	
		26.694	0.000	Suma cuadrática de residuales (minimizada para determinar desfase temporal entre las copas de Faraday)	

Figura C.26. Ejemplo del cálculo de las relaciones isotópicas en Excel por LRS.

➤ **Método del punto a punto (PbP)**

Para el método punto por punto (PbP), el cálculo de la relación isotópica se realiza individualmente para cada medición simultánea a lo largo del cromatograma. La relación isotópica resultante serán el promedio de las individuales. En este caso, la selección de los puntos es muy importante ya que no podemos seleccionar puntos en que los analitos no están presentes, ya que afectaría en gran medida al cálculo total de la relación isotópica. Para este método, se han seleccionado entre 1 (*Peak Apex*) y 21 puntos de cada cromatograma para el cálculo. Tenemos que tener en cuenta que el pico está definido por 20-40 puntos. En la Figura C.27 se muestran los valores de la relación isotópica 202/198 del Hg en cada punto del pico cromatográfico. La relación final obtenida será el promedio de estos 21 puntos sobre el pico.

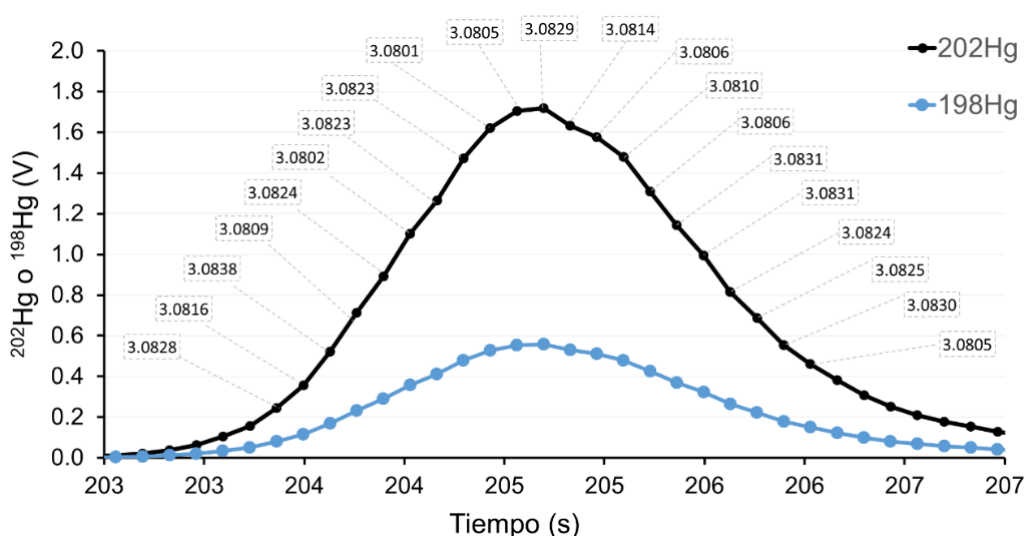


Figura C.27. Representación de las relaciones isotópicas 202/198 Hg en cada punto del pico cromatográfico, el cual corresponde a la masa ²⁰²Hg.

Por analogía con el método LRS y con el propósito de comparación, la incertidumbre en la relación isotópica se calcula como el error estándar de la media:

$$u_{PbP} = \sqrt{\frac{n}{n-1} \sum \left(\left(\frac{V_{xxx}}{V_{198}} \right)_i - \left(\frac{V_{xxx}}{V_{198}} \right) \right)^2} \quad \text{Ec. C.10}$$

➤ **Método de integración del área de pico (PAI)**

Mediante el método de integración del área de pico (PAI), la relación de isótopos se calcula dividiendo la suma de los voltajes obtenidos para cada isótopo en el rango seleccionado. Estas intensidades estarán corregidas mediante la substracción del fondo.

C.5.3.3. Corrección de la discriminación de masas para relaciones precisas (ecuación de Russell)

Para las medidas de relaciones isotópicas con alta precisión y exactitud, el procedimiento requiere la introducción de un patrón para corregir el error de discriminación de masas producido en la interfase del ICP-MS. Esta corrección podría realizarse añadiendo un estándar, que fuese volátil o derivatizable, a la muestra, y que eluyese en un tiempo de retención próximo a los analitos, dentro de la columna cromatográfica (dentro del tiempo total de adquisición entre 10-12 min). Sin embargo, se ha publicado previamente, durante la elución de los analitos es posible tener una variación en la relación isotópica de TI, lo que también tendría un impacto en la relación isotópica de los isótopos de interés.¹⁸¹ Para evitar este problema, la introducción del estándar interno, talio en nuestro trabajo, se realiza continuamente mediante nebulización convencional como se ha explicado previamente. TI se usa para la corrección como un isótopo análogo al Hg y no interfiere en su detección, mediante la medida de las m/z 205 y 203, de los dos isótopos de TI. La introducción continua permite detectar cualquier variación posible en la relación de isótopos a lo largo de la cromatografía, mediante una sencilla representación de la intensidad de uno de los isótopos frente al otro. La solución de TI se introduce en una proporción aproximada de 1:1

(205 Tl: 202 Hg), para asegurar la mayor similitud en el comportamiento de ambas especies. Para la corrección de las relaciones isotópicas para la discriminación de masas se ha empleado la ecuación de Russell:

$$\left(\frac{{}^{xxx}\text{Hg}}{198\text{Hg}}\right)_{corrected} = \frac{\left(\frac{{}^{xxx}\text{Hg}}{198\text{Hg}}\right)_{measured}}{\left(\frac{M^{xxx}}{M^{198}}\right)^f} \quad \text{Ec. C.11}$$

donde M es el peso atómico del isótopo correspondiente y f es el factor de corrección. El cálculo de f adaptado para los isótopos de talio es:

$$f = \log \left(\frac{\left(\frac{{}^{205}\text{Tl}}{203\text{Tl}}\right)_{measured}}{\left(\frac{{}^{205}\text{Tl}}{203\text{Tl}}\right)_{theoretical}} \right) \quad \text{Ec. C.12}$$

Las relaciones de isótopos de Tl medidos se calcularon mediante el procedimiento LRS (ordenada en el origen establecida en cero) dentro del rango de puntos de adquisición seleccionados para la medida de las relaciones de isótopos específicos del compuesto. Se puede considerar que al trabajar con señales continuas, tanto el procedimiento del método PbP como el del método LRS proporcionan los mismos valores de relaciones isotópicas e incertidumbres.²⁸⁴

C.5.3.4. Cálculo del valor de Hg ($\delta^{xxx}\text{Hg}$ y $\Delta^{xxx}\text{Hg}$)

Como se ha comentado en la Sección A.5, el cálculo de las relaciones isotópicas de Hg se realiza a partir de la siguiente ecuación:

$$\delta^{xxx}\text{Hg} = \left(\frac{\left(\frac{{}^{xxx}\text{Hg}}{198\text{Hg}}\right)_{sample}}{\left(\frac{{}^{xxx}\text{Hg}}{198\text{Hg}}\right)_{3133}} - 1 \right) \times 1000 \text{‰} \quad \text{Ec. C.13}$$

Donde xxx se corresponde con las masas 199, 200, 201 y 202. En este caso es una relación isotópica relativa al NIST SRM 3133. Este estándar se mide antes y después de cada muestra en una estrategia de corrección denominada *bracketing* estándar-muestra-estándar. La relación

isotópica del estándar se determina como el promedio entre la relación isotópica anterior y posterior a la muestra. El Hg(II)-3133 se introduce en una relación de 1:1 estándar: muestra para garantizar la mayor precisión y exactitud.¹⁵⁸ Por otro lado, el valor del MIF representado por $\Delta^{xxx}\text{Hg}$ se calcula con las siguientes ecuaciones (ver Sección A.5):

$$\Delta^{199}\text{Hg} = \delta^{199}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.2520) \quad \text{Ec. C.14}$$

$$\Delta^{200}\text{Hg} = \delta^{200}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.5024) \quad \text{Ec. C.15}$$

$$\Delta^{201}\text{Hg} = \delta^{201}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0.7520) \quad \text{Ec. C.16}$$

C.6. Determinación de $\delta^{13}\text{C}$ para el metilmercurio (CH_3Hg)

C.6.1. Procedimiento para la medida de $\delta^{13}\text{C}$ por PT-GC-IRMS

El GC-IRMS es un equipo diseñado específicamente para la medida de deltas, también se encuentran especificados por el fabricante una serie de parámetros de calidad relacionados con la dicha medida. En primer lugar, se requiere la oxidación del reactor (durante 2h) con el objetivo de regenerar las especies de Ni y Cu para un proceso eficiente de combustión. Transcurrido este tiempo debe llevarse a cabo la determinación de los parámetros de estabilidad y linealidad. Los tests de estabilidad se realizan con diez pulsos, para una dilución del CO_2 de referencia del 86%. De esos pulsos, el primero se desecha y el segundo se toma como referencia en el cálculo del $\delta^{13}\text{C}$. Para evaluar la linealidad se sigue el mismo procedimiento, pero con pulsos de intensidad creciente empleando diferentes diluciones del CO_2 de referencia, y se traza una recta de $\delta^{13}\text{C}$ vs. mV de m/z 44. Tanto el valor de la pendiente de esta recta como la desviación estándar del promedio de los valores de $\delta^{13}\text{C}$ cero deben estar por debajo de 0.06 ‰, según especificaciones del fabricante.

Las muestras se preparan con un volumen total de 10 mL y se sitúan en el auto-muestreador del equipo de Purga y Trampa. La secuencia de muestras en el sistema PT-GC-IRMS es la siguiente: (i) Blanco (vial vacío), (ii) Blanco (agua Milli-Q), (iii) Muestras 1,2,3,4,5, (iv) patrón de BTEX. Este sistema permite realizar una oxidación parcial de 2 min del reactor entre muestras (*Seed Oxidation*), lo cual mejora su eficiencia a lo largo de la sesión de medida. En la interfase de combustión todo lo que eluye de la columna es transformado en CO_2 . Posteriormente el CO_2 se ioniza, se separa en el imán y se detectan simultáneamente las masas 44, 45 y 46 en el detector. El tiempo de adquisición total del cromatograma es de 20 min para los compuestos etilados de Hg (14 min para BTEX). El sistema se sitúa en modo blackflush durante 207 s (157 s para BTEX) y de nuevo a partir de 855 s (655 s para BTEX). Durante el modo backflush se miden pulsos de CO_2 , y una vez que inicia la elución de los compuestos, el sistema pasa a modo directo, con lo que se introduce el flujo procedente de la columna de GC.

C.6.2. Cálculo de las relaciones isotópicas relativas ($\delta^{13}\text{C}$) de CH_3Hg

Los valores de $\delta^{13}\text{C}$ medidos en este trabajo se expresan en relación con un gas de trabajo de referencia de CO_2 de alta pureza que se calibró previamente mediante inyecciones de una solución estándar de mezcla de alcanos $\text{C}_{15}\text{-C}_{13}\text{-C}_{20}$ con certificado $\delta^{13}\text{C}$. Las relaciones $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ medidas para cada BTEX y compuestos etilados de Hg (II) y CH_3Hg se normalizan según el estándar de referencia de Viena Pee Dee Belemnite (VPDB) y se expresan en notación δ como se muestra en la ecuación C.17. Por convenio, la abundancia relativa de los isótopos está referida al isótopo pesado.

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{VPDB}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ (‰)} \quad \text{Ec. C.17}$$

La peculiaridad del equipo GC-IRMS es que tiene un software integrado que permite obtener directamente los valores de $\delta^{13}\text{C}$ expresados en relación a un gas de trabajo de referencia de CO_2 de alta pureza calibrado contra la mezcla de alcanos certificada en $\delta^{13}\text{C}$. Las relaciones $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ están normalizadas por el estándar de referencia *Vienna Pee Dee Belemnite* (VPDB) y se expresan en notación δ .

El estándar *Pee Dee Belemnite* (PDB) es la referencia primaria para la medida de las variaciones naturales en la relación isotópica del carbono. Se trata de un carbonato de calcio que procede de una belemnita cretácica, obtenida en Carolina del Sur (EE. UU.). Su relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ o RPDB es 0,0112372. El PDB está agotado desde hace años, pero sigue siendo la referencia primaria para expresar las variaciones naturales de la relación isotópica del carbono y según la cual son calibrados los materiales de referencia. Las determinaciones isotópicas de la abundancia natural en ^{13}C son expresadas entonces, por consenso, en relación al VPDB disponible en la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA) en Viena (Austria). La relación isotópica $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ se calcula como la relación de áreas de pico $^{12}\text{CO}_2^+$ (m/z 44) y $^{13}\text{CO}_2^+$ (m/z 45). Como se observa en la Tabla C.9, la masa m/z está representada prácticamente por un isotópologo, mientras que la masa 45 tiene un 6.5% de contribución de ^{17}O , lo que representa

una interferencia isobárica significativa. Debido a la presencia del O₂ ambiental se hace imprescindible corregir esta contribución a través de la medida de la masa 46. La transformación de la señal 44/45 en ¹²C/¹³C la realiza el propio software a través de un algoritmo que introduce la corrección para la contribución del ¹⁷O a la masa 45 del CO₂, mediante la medida de la masa 46. El fundamento de dicha transformación está normalizado por la IUPAC e integrado en el propio software. ²⁸⁵

Tabla C.9. Isotopólogos de la molécula CO₂, abundancias isotópicas y contribución de cada uno de ellos a las masas 44, 45 y 46.

Especie poliatómica	m/z	Abundancia isotópica	Abundancia por masa	Contribución por masa (%)
¹² C ¹⁶ O ¹⁶ O	44	0.98458	0.98458	100
¹³ C ¹⁶ O ¹⁶ O	45	0.01073		93.5
¹² C ¹⁶ O ¹⁷ O	45	0.00075	0.01148	6.5
¹² C ¹⁶ O ¹⁸ O	46	0.00405		99.8
¹³ C ¹⁶ O ¹⁷ O	46	8.18E-06	0.00406	0.2
¹² C ¹⁷ O ¹⁷ O	46	1.43E-07		0.0

C.6.3. Corrección de la contribución del contenido de C del derivatizante

La derivatización de las especies de mercurio por alquilación para el análisis por PT-GC-IRMS introduce átomos de C exógenos. El tetraetilborato de sodio introduce dos átomos de C a la especie de CH₃Hg. Esta contribución facilita la medida de por GC-C-IRMS, debido a que su contenido de C es más elevado y con ello la sensibilidad. Sin embargo, esta contribución debe corregirse para el cálculo de los valores de δ¹³C. Para ello se introduce el Hg(II), el cual tiene 4 átomos de C procedentes de la etilación con el NaB(C₂H₅)₄. Además, el Hg(II) introducido en la disolución actúa como estándar interno, ya que permite corregir el fraccionamiento que experimentan los átomos de C durante las etapas de análisis.

Una vez medidos los valores de δ¹³C de los átomos de carbono exógenos del etilo, determinados a partir del pico de Hg(C₂H₅)₂. Se puede establecer un balance de masa para

estimar los valores $\delta^{13}\text{C}$ endógenos de CH_3Hg . Los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ se pueden estimar a partir de la siguiente ecuación:

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hgcorr}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)} \times 3 - \delta^{13}\text{C}_{\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)_2} \times 2 \quad \text{Ec. C. 18.}$$

Masbou *et al.* (2015),²⁸⁶ demostraron que es posible corregir la contribución del grupo alquilo procedente del reactivo de derivatización simplemente mediante la adición y posterior derivatización de Hg(II) en la misma solución.

C.7. Medida $^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$ en muestras de pelo por ablación láser

En este trabajo, se ha aplicado la metodología descrita anteriormente, ^{287,288} al estudio de la variación longitudinal del mercurio en las hebras de pelo de los trabajadores expuestos ocupacionalmente. El láser se enfoca en un punto de unos 0,05 mm de diámetro y se toman muestras cada 1 mm comenzando por la zona más próxima a la raíz. La Figura C.28 muestra una imagen ampliada del “pelo 5” tras el proceso de ablación. Los puntos que se observan en el pelo están espaciados 1 mm y corresponde con los puntos de muestreo realizados. Como se puede observar, se vaporiza selectivamente una sección del pelo durante la ablación.

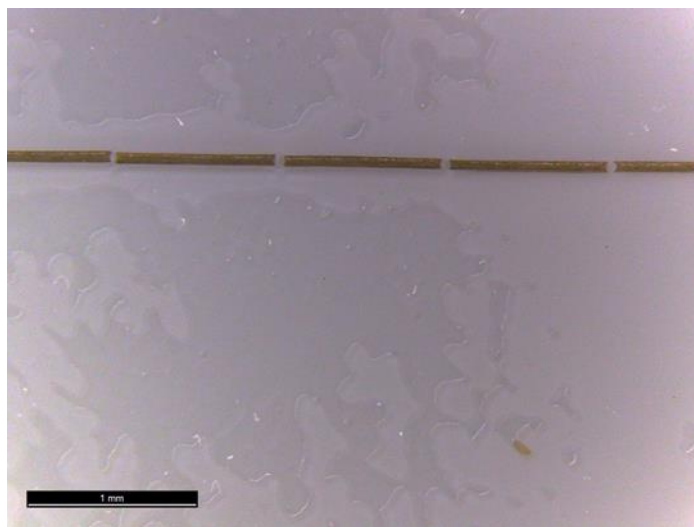


Figura C.28. Detalle de una sección del pelo 5 tras la ablación láser cada 1 mm.

Para el “pelo 1” se realizaron 71 puntos de muestreo mientras que para el “pelo 2” (más corto) solo 50. Igualmente, para el “pelo 4” se realizaron 69 puntos de muestreo y para el “pelo 5” 104 puntos en otros días de medidas. En cada punto de muestreo se obtiene una señal transiente de unos 10 segundos. La incorporación del Hg al pelo se evaluó a través de la medida de la relación $^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$ en función de la distancia a la raíz. El azufre presenta un contenido constante en el pelo debido a su presencia en la queratina que es la proteína que forma el pelo, por lo que se emplea como estándar interno. El Hg presentará un valor variable dependiendo de la tasa de incorporación al pelo, ya sea por incorporación interna o adsorción directa. La relación $^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$ en cada punto de muestreo se determinó a partir de la relación de áreas área bajo las dos curvas mediante el método de los trapecios.

D. Resultados

D.1. Determinación de especies de mercurio en muestras biológicas por análisis de dilución isotópica con múltiples trazadores.

Artículo científico I

Analytical Chemistry. 2017, 89, 6731–6739

Development of a Common Procedure for the Determination of Methylmercury, Ethylmercury and Inorganic Mercury in Human Whole Blood, Hair and Urine by Triple Spike Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry

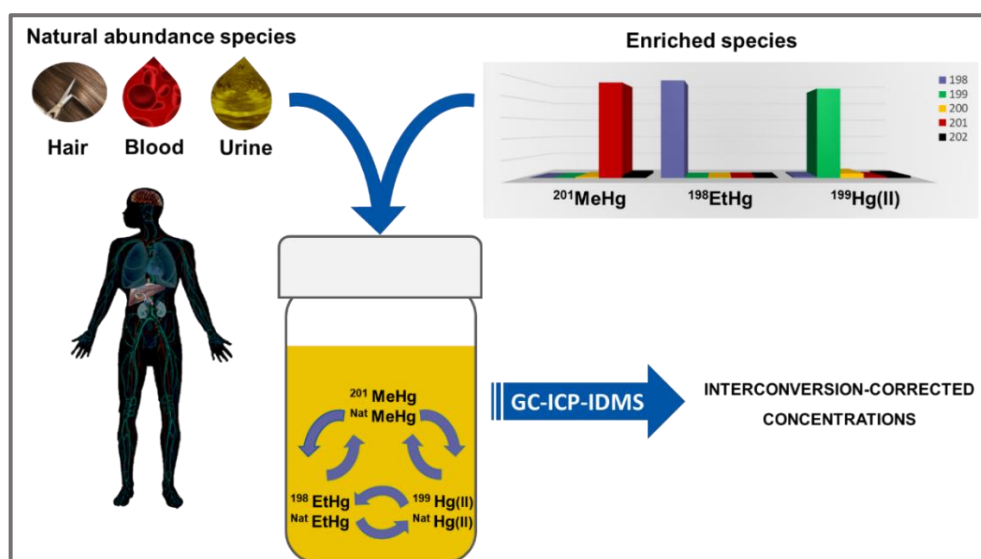
Silvia Queipo Abad, Pablo Rodríguez González, W. Clay Davis and José Ignacio García Alonso

Artículo científico II

Enviado a *Analytical and Bioanalytical Chemistry*

Certification of methylmercury, inorganic mercury, total mercury, mono-, di- and tri-butyltin, content, in the fresh-frozen reference material SRM 1974c (*Mytilus edulis*)

W. Clay Davis, Silvia Queipo Abad, Pablo Rodríguez González, José Ignacio García Alonso



D.1.1. Introducción

El Hg y sus compuestos presentan un riesgo tanto para los seres vivos como para el medio ambiente. Las especies de mercurio se encuentran a nivel medioambiental formando parte de un ciclo biogeoquímico de transformaciones.^{42,53} Una de las especies que presenta un mayor interés es el MeHg debido a sus implicaciones en la salud humana a través del consumo de pescado y marisco. El control de estas especies a nivel clínico y alimentario pasa por la implementación de metodologías de análisis que aporten resultados con buena exactitud y precisión. La separación de las especies de mercurio se realiza mayoritariamente mediante cromatografía de gases con derivatización previa de los analitos, normalmente alquilación. En las últimas décadas se ha demostrado que el empleo de GC-ICP-MS en combinación con el análisis por dilución isotópica (IDMS) permite obtener resultados fiables y de calidad en el análisis de especiación de mercurio en diferentes muestras biológicas.²⁸⁹⁻²⁹³ La principal dificultad de este análisis multiespecie es la interconversión de dichos compuestos durante las etapas previas de preparación de la muestra. Esta evidencia hace que sea esencial el uso de Dilución Isotópica específica de la especie con múltiples trazadores. Esta metodología es la que presenta un mayor potencial en la cuantificación exacta y precisa de las especies de Hg. Monperrus *et al.*²¹² presentaron las ventajas y limitaciones del uso de IDMS con trazador doble en estos análisis de especiación. El uso de la herramienta matemática conocida como Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD) permite simplificar el desarrollo clásico de las ecuaciones de dilución isotópica, especialmente cuando se producen interconversiones entre especies.²⁰⁸ El método es capaz de determinar el número de moles de cada especie individual en la mezcla de análisis, así como los factores de conversión durante el procedimiento experimental de preparación de la muestra.

La cuarta especie de mercurio en importancia para los seres humanos, tras el Hg(0), Hg(II) y MeHg, son los compuestos de etilmercurio con un comportamiento aparentemente similar al del MeHg.^{34,78} La presencia de especies de etilmercurio (EtHg) en el cuerpo humano es causada por la descomposición del tiosalicilato de etilmercurio comercializado con el nombre de Timerosal. Existe un interés en evaluar el impacto del EtHg en la salud, pero se carece de las herramientas que permitan su detección con exactitud y precisión, junto con el resto de las

especies. En este caso se requiere del empleo de dilución isotópica con trazador triple, lo que conlleva el marcaje de cada especie de mercurio con un trazador enriquecido en un isótopo diferente. Los bajos niveles de compuestos de Hg encontrados en muestras humanas implican el uso de técnicas analíticas de alta sensibilidad, como es el caso de GC-ICP-MS. Esta metodología se validará para la determinación precisa de las tres especies de mercurio con una alta probabilidad de coexistencia en el cuerpo humano, en las tres matrices más comunes empleadas para los estudios clínicos: sangre, orina y pelo. Las diferentes características de dichas matrices proporcionan información específica sobre la fuente de contaminación por mercurio. También se emplean para evaluar los efectos en la salud originados por los compuestos de mercurio en el organismo.

El desarrollo e implementación de metodologías requiere de la disponibilidad de materiales de referencia certificados que permitan su validación.²⁹⁴ Un material de referencia apropiado debe presentar una composición de matriz y concentraciones de analito similares a las de las muestras reales. Además, las concentraciones de analito en materiales de referencia certificados deben ser homogéneos, estables y, por supuesto, estar certificados de manera exacta y precisa.²⁹⁵ Los tejidos "húmedos" recién congelados son más representativos de las muestras, que aquellos que por ejemplo han pasado por un proceso de liofilización.²⁹⁶ El SRM 1974, producido en 1989 por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), fue el primer material de referencia y congelado de una muestra de mejillón recogida en la Bahía de Dorchester (Puerto de Boston).²⁹⁷ Se emitió con valores de concentración certificados para 9 hidrocarburos aromáticos policíclicos. Una vez que los suministros se agotaron, se prepararon nuevos materiales de la misma naturaleza: SRM 1974a que incluyó MeHg²⁹⁸ y SRM 1974b, con MeHg certificado aplicando dos métodos independientes basados en espectrometría de masas por IDMS.²⁹⁶ Actualmente, el suministro de SRM 1974b se ha agotado, por lo que se encuentra disponible un nuevo SRM 1974c, congelado fresco, preparado a partir de una muestra de mejillones (*Mytilus edulis*) recolectados en la Bahía de Dorchester (MA, EE. UU.). En este trabajo se ha determinado la concentración de MeHg y HgT así como de compuestos orgánicos de estaño butilados. Los compuestos de butilestaño, mono, di y tributilestaño (MBT, DBT y TBT, respectivamente) se han utilizado ampliamente como estabilizadores plásticos, biocidas,

conservantes de madera y el TBT también en pinturas en cascos de barcos, de ahí su presencia en los ecosistemas marinos, causando trastornos en la flora y fauna marina.²⁹⁹ Para este propósito, las medidas para IDMS específica de la especie en combinación con GC-ICP-MS se realizaron en dos laboratorios diferentes (NIST y la Universidad de Oviedo). En el caso del análisis de especiación de Hg, se aplicó IDMS específico de la especie con trazador doble para corregir las reacciones de metilación y desmetilación que se producen durante el procedimiento de preparación de la muestra.²⁷⁸ Para la determinación de los compuestos de butilestaño, se aplicó IDMS con un solo trazador, ya que el riesgo de transformaciones se minimizó aplicando condiciones de extracción previamente validadas.¹⁹⁹

D.1.2. Objetivos

El objetivo de este Objetivo es el desarrollo y aplicación de metodologías de alta fiabilidad para la **Determinación de especies de mercurio en muestras biológicas por análisis de dilución isotópica con múltiples trazadores**. Para este fin se han desarrollado los siguientes objetivos individuales:

- Caracterización de los trazadores enriquecidos de MeHg, Hg(II) y EtHg mediante el empleo de patrones de abundancia natural por análisis de dilución isotópica inversa. Para ello es necesario desarrollar una estrategia de caracterización del EtHg enriquecido por la falta de patrón de abundancia natural.
- Desarrollo de la metodología GC-ICP-MS para la medida simultánea de MeHg, EtHg y Hg(II) con triple trazador. Validación de la metodología mediante el empleo de los materiales de referencia SRM 955c (sangre de cabra), IAEA-085 e IAEA-086 (pelo humano) y adiciones a las muestras (orinas).
- Evaluación del grado de interconversión entre especies producido durante la preparación de la muestra.
- Certificación de un nuevo material de referencia de tejido de mejillón congelado fresco, con concentraciones de especies de Hg(II) y MeHg en el rango de ng g⁻¹. Este trabajo se ha desarrollado en colaboración con el NIST, y para ello también se ha realizado la certificación de compuestos orgánicos de butilestaño.

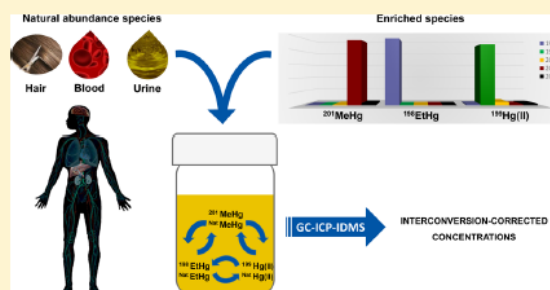
D.1.3. Artículo Científico I

Development of a Common Procedure for the Determination of Methylmercury, Ethylmercury, and Inorganic Mercury in Human Whole Blood, Hair, and Urine by Triple Spike Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry

Silvia Queipo Abad,[†] Pablo Rodríguez-González,^{*,†,‡} W. Clay Davis,[‡] and José Ignacio García Alonso^{†,‡}[†]Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006 Oviedo, Spain[‡]Chemical Sciences Division, National Institute of Standards and Technology, Charleston, South Carolina 29412, United States

Supporting Information

ABSTRACT: We report the first common methodology for the simultaneous determination of methylmercury (MeHg), ethylmercury (EtHg), and inorganic mercury (Hg(II)) in human blood hair and urine. With the exception of the initial sample mass (0.15 g for blood, 0.5 g for urine, and 0.1 g for hair), the same sample preparation and gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (GC-ICPMS) measurement conditions are employed for the three matrices providing experimental values in agreement with the certified values in the analysis of NIST SRM 955c (Caprine Blood) Level 3 and the certified human hairs IAEA 085 and IAEA 086. Also, the method provides quantitative recoveries for the three Hg species in the analysis of fortified human urine samples at 1, 2, and 5 ng Hg g⁻¹. Mercury species concentrations for levels 2 and 4 of SRM 955c are reported here for the first time. A systematic interconversion of EtHg into Hg(II) was obtained for all matrixes reaching values up to 95% in blood, 29% in hair, and 11% in urine. MeHg dealkylation was also observed in a lesser extent in blood and hair analyses, but it was not observed when analyzing urine samples. Hg methylation was not observed in any matrix. The amount of NaBPr₄ added for derivatization has been found to be the main factor responsible for Hg species interconversion. This work demonstrates for the first time that experimental conditions optimized for SRM 955c (caprine blood) are not valid for human blood samples as the optimum initial sample amount for a real sample is more than 3 times lower than that for SRM 955c.



Mercury presents a highly complex biogeochemical cycle as it exists in different chemical forms and oxidation states in many terrestrial and aquatic ecosystems.¹ Humans are exposed to elemental mercury (Hg⁰) when it is released to the atmosphere by different natural processes such as volcanic eruptions and anthropogenic activities like fossil fuel combustion. Dental amalgams may release elemental mercury into the human body,² which can be eventually oxidized to Hg(II) by catalase reaction in the erythrocytes.³ Methylmercury (MeHg) is a highly neurotoxic compound formed from the biotic methylation of inorganic mercury (Hg(II)) at the water–sediment interface in aquatic ecosystems. It can be biomagnified through the food chain by a factor of 10⁵–10⁷ in predatory fish causing adverse effects in humans and wildlife via fish consumption.⁴ Ethylmercury (EtHg) has similar physicochemical properties than MeHg⁵ and is used in multidose vials of vaccines as a preservative due to its bactericidal and fungicidal properties.

Most of the current clinical studies of Hg exposure in humans are exclusively focus on the determination of total Hg concentrations. However, speciation analysis provides valuable information not only on the distribution of Hg species among

different populations but also on possible contamination pathways. Blood, urine, and hair are usually analyzed to evaluate mercury exposition in humans as each of these matrixes may provide specific information about the source of mercury contamination. For example, organomercury compounds are preferentially found in blood and hair but they can also be excreted and detected in urine. Hg(II) is accumulated in kidneys and excreted in urine, while its levels in blood reflects short-term exposure.⁶ In addition, stable isotope analysis showed that inorganic mercury levels in urine are also consequence of demethylation of methylmercury.⁷ Total mercury levels in hair correspond mainly to MeHg,⁸ although the environmental or occupational exposure to gaseous Hg⁰ could increase Hg(II) concentrations.⁹

The development of efficient tools for the monitoring of environmental and occupational exposure of humans to Hg is important. However, such tools should be able to discriminate

Received: March 15, 2017

Accepted: May 12, 2017

Published: May 12, 2017

Development of a Common Procedure for the Determination of Methylmercury, Ethylmercury and Inorganic Mercury in Human Whole Blood, Hair and Urine by Triple Spike Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry

Silvia Queipo Abad[§], Pablo Rodríguez-González^{§*}, W. Clay Davis[†], José Ignacio García Alonso[§]

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

[†]*Chemical Sciences Division, National Institute of Standards and Technology, Charleston, South Carolina 29412, United States*

*Author for correspondence: rodriguezpablo@uniovi.es

ABSTRACT

We report the first common methodology for the simultaneous determination of methylmercury (MeHg), ethylmercury (EtHg) and inorganic mercury (Hg(II)) in human blood, hair, and urine. With the exception of the initial sample mass (0.15 g for blood, 0.5 g for urine and 0.1 g for hair), the same sample preparation and GC-ICP-MS measurement conditions are employed for the three matrices providing experimental values in agreement with the certified values in the analysis of NIST SRM 955c (*Caprine blood*) Level 3 and the certified human hairs IAEA 085 and IAEA 086. Also, the method provides quantitative recoveries for the three Hg species in the analysis of fortified human urine samples at 1, 2 and 5 ng Hg g⁻¹. Mercury species concentrations for levels 2 and 4 of SRM 955c are reported here for the first time. A systematic interconversion of EtHg into Hg(II) was obtained for all matrices reaching values up to 95% in blood, 29% in hair and 11% in urine. MeHg dealkylation was also observed in a lesser extent in blood and hair analyses but it was not observed when analyzing urine samples. Hg methylation was not observed in any matrix. The amount of NaBPr₄ added for derivatization has been found to be the main factor responsible for Hg species interconversion. This work demonstrates for the first time, that experimental conditions optimized for SRM 955c (caprine blood) are not valid for human blood samples as the optimum initial sample amount for a real sample is more than three times lower than that for SRM 955c.

1. INTRODUCTION

Mercury presents a highly complex biogeochemical cycle as it exists in different chemical forms and oxidation states in many terrestrial and aquatic ecosystems.¹ Humans are exposed to elemental mercury (Hg(0)) when it is released to the atmosphere by different natural processes such as volcanic eruptions and anthropogenic activities like fossil fuel combustion. Dental amalgams may release elemental mercury into the human body² which can be eventually oxidized to Hg(II) by catalase reaction in the erythrocytes.³ Methylmercury (MeHg) is a highly neurotoxic compound formed from the biotic methylation of inorganic mercury (Hg(II)) at the water-sediment interface in aquatic ecosystems. It can be biomagnified through the food chain by a factor of 105-107 in predatory fish causing adverse effects in humans and wildlife via fish consumption.⁴ Ethylmercury (EtHg) has similar physicochemical properties than MeHg⁵ and is used in multidose vials of vaccines as a preservative due to its bactericidal and fungicidal properties.

Most of the current clinical studies of Hg exposure in humans are exclusively focus on the determination of total Hg concentrations. However, speciation analysis provides valuable information not only on the distribution of Hg species among different populations, but also on possible contamination pathways. Blood, urine and hair are usually analyzed to evaluate mercury exposition in humans, as each of these matrices may provide specific information about the source of mercury contamination. For example, organomercury compounds are preferentially found in blood and hair but they can also be excreted and detected in urine. Hg(II) is accumulated in kidneys and excreted in urine, while its levels in blood reflects short term exposure⁶. In addition, stable isotope analysis showed that inorganic mercury levels in urine are also consequence of demethylation of methylmercury.⁷ Total mercury levels in hair correspond mainly to MeHg,⁸ although the environmental or occupational exposure to gaseous Hg(0) could increase Hg(II) concentrations.⁹

The development of efficient tools for the monitoring of environmental and occupational exposure of humans to Hg is important. However, such tools should be able to discriminate between the different compounds in which Hg is present in the environment. The main problem arises from the possible occurrence of matrix-dependent alkylation and dealkylation reactions during the sample preparation and separation steps, leading to erroneous determinations. The application of species-specific isotope dilution procedures has drastically improved the quality of data on mercury speciation analysis in real samples. The use of multiple spiking enables not only highly accurate and precise determinations but also the quantification of the extent of interconversion reactions between Hg compounds. For this purpose, all measured compounds must be isotope diluted with a different mercury isotope in such a way that labelled and endogenous compounds must be completely mixed before the occurrence of any transformation reaction. In the case of Hg, double spiking approaches have been employed to determine MeHg and Hg(II) mainly in environmental samples. So far, the analysis of hair samples has been only reported by Rahman *et al.*¹⁰ and Laffont *et al.*¹¹ using a double spike approach to determine MeHg and Hg(II). When EtHg must be also determined a triple spiking procedure is required. Three

previous works have presented a triple spiking approach for Hg speciation analysis in human samples thus far. Davis and Long¹² applied a triple spike procedure for the certification of the standard reference material NIST SRM 955c (*Caprine blood*), whereas Sommer *et al.*¹³ and Rahman *et al.*¹⁴ applied a triple spike procedure combined with SPME-GC-ICP-MS to the determination of MeHg, EtHg and Hg(II) in human blood samples. However, those procedures were not tested in other human samples such as urine or hair thus far.

When developing the present work, we have considered two critical aspects. First, interconversion reactions occurring during Hg speciation analysis in environmental and biological samples are matrix dependent and hence the application of multiple spiking procedures is mandatory to achieve accurate results.¹⁵ Secondly, the simplification and normalization of the sample preparation conditions facilitate the implementation of such sophisticated approaches for a routine clinical basis. Our first objective was therefore the development of the first common procedure for the simultaneous quantification of MeHg, EtHg and Hg(II) in human blood, urine and hair. The methodology was applied to the analysis of NIST SRM 955c (caprine blood) and the human hair reference materials IAEA 085 and IAEA-086. Due to the lack of a certified urine, recovery studies in real samples for the three mercury compounds were carried out. The very low levels of Hg compounds in human samples and the complexity of the matrices compelled us to exhaustively optimize all sample preparation steps to achieve the highest sensitivity. Pursuing this objective, we report for the first time that optimized conditions for the analysis of SRM 955 are not valid for the analysis of real human blood samples.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Instrumentation

The alkaline digestion of the samples was performed using a focused microwave Explorer Hybrid from CEM Corporation (Matthews, NC, USA). A gas chromatograph model Agilent 6890N (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) fitted with a split/splitless injector and a DB-5MS capillary column from Agilent J&W Scientific (cross-linked 5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane, 30 m × 0.53 mm i.d. × 1.0 μm) was coupled to an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer Agilent 7500ce using a laboratory-made transfer line¹⁶. More details on the instrumentation and instrumental conditions of the GC-ICP-MS system are described Table S1 of the Supporting information.

2.2. Reagents and materials

Blood Standard Reference Material 955c (*Caprine Blood*) was obtained from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). The Certified Reference Materials of human hair IAEA-085 and IAEA-086 were purchased from the International Atomic Energy Agency (IAEA, Vienna, Austria). MeHg enriched in ^{201}Hg , Hg(II) enriched in ^{199}Hg and EtHg enriched in ^{198}Hg were obtained from ISC-Science (Oviedo, Spain). Detailed information about all reagents employed in this work is given in the Supporting Information. A thorough characterization of the isotopically enriched Hg compounds was carried out, particularly for EtHg for which there is no commercially available natural abundance standard. Details on the characterization of the spike solutions are also given in the Supporting Information (Figures S1 to S4 and Table S2).

2.3. Procedures

2.3.1. Focused microwave assisted digestion

Samples were directly weighed in 10 mL disposable glass vials. The optimum amount of sample was 0.15 g for blood, 0.5 g for urine and 0.1 g for hair analysis. Immediately, appropriate amounts of ^{201}Hg -enriched MeHg, ^{198}Hg -enriched EtHg and ^{199}Hg -enriched Hg(II) were added to obtain an amount ratio of endogenous vs labelled compound between 0.1 and 10. Then 3 mL of 25% TMAH was added and a magnetic stir bar was introduced into the vial. The vial was closed with a Teflon cap and placed in the microwave cavity. The focused microwave assisted extraction of the sample was performed using a fixed power of 35 W for 4.5 min.

2.3.2. Derivatization, purification and preconcentration of the samples.

After digestion, the whole extract was transferred to a 22 ml clear glass vial containing 4 mL of an acetic acid/sodium acetate buffer (0.1 M, pH 4). Then, the pH was adjusted to pH 4 using sub-boiled HCl 10%. For derivatization, a 20% solution of the derivatization reagent in THF was previously aliquoted and stored at -18°C . Before each sample preparation session, the reagent was diluted ten times with ultrapure water to ensure that each aliquot was thawed only once. The derivatization and liquid-liquid extraction was carried out adding 0.4 mL of a 2% w/v sodium (tetra-n-propyl)borate in Milli-Q water and 1 ml of hexane. Simultaneous propylation and extraction into hexane was accomplished after five minutes of manual shaking. Then, the sample was centrifuged at 5000 rpm for 5 min, and most of the organic layer was transferred to another vial. The sample was then cleaned up using a homemade Florisil® column¹⁷ and stored in a 2 mL clear glass vial at -18°C until analysis. Just before the GC-ICP-MS injection the sample was pre-

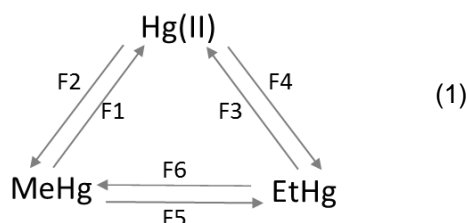
concentrated under a gentle stream of nitrogen. A scheme of the whole sample preparation procedure is showed in Figure S5 of the Supporting Information.

2.3.3. Measurement of the isotopic composition of the samples by GC-ICP-MS

Daily optimization of the ion lenses was performed after the connection of the GC to the ICP-MS by using the signal of $^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ and $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$. Integration of the chromatographic peaks was carried out using the commercial software supplied with the ICP-MS instrument. The integration time per isotope was 80 ms and the isotopes measured were 198, 199, 200, 201 and 202. Mass bias correction was performed using an internal correction based on the minimization of the square sum of the residuals of the multiple linear regression employed for quantification as explained elsewhere¹⁸.

2.3.4. Triple Spike Isotope Dilution Equations

For the calculation of the concentration of the three mercury compounds it was assumed that the isotopic composition in a mixture of natural abundance and labeled compounds is a linear combination of the isotope patterns of the different constituents of the mixture. Thus, applying multiple linear regression the molar fraction of natural abundance and isotopically enriched compounds can be calculated for each chromatographic peak. The general equations for triple spike isotope dilution are based on those previously developed for simultaneous determination of tin compounds¹⁹. If we consider a system of three interconverting mercury species as described in Equation 1 we can define six interconversion factors from F1 to F6.



Due to its high volatility and the absence of an isotopically enriched analogue Hg(0) was not considered in this model. Nevertheless, transformations to Hg(0), although not quantified, are corrected by the proposed isotope dilution approach. Expressing the isotope abundances of the isotope diluted sample as a function of the Hg natural isotope abundances and the isotope abundances of the isotopically enriched tracers we can define for each chromatographic peak a matrix equation similar than Equation 2 that can be solved by multiple linear regression.

$$\begin{bmatrix} A_m^{198} \\ A_m^{199} \\ A_m^{200} \\ A_m^{201} \\ A_m^{202} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{\text{nat}}^{198} & A_{\text{MeHg}}^{198} & A_{\text{Hg(II)}}^{198} & A_{\text{EtHg}}^{198} \\ A_{\text{nat}}^{199} & A_{\text{MeHg}}^{199} & A_{\text{Hg(II)}}^{199} & A_{\text{EtHg}}^{199} \\ A_{\text{nat}}^{200} & A_{\text{MeHg}}^{200} & A_{\text{Hg(II)}}^{200} & A_{\text{EtHg}}^{200} \\ A_{\text{nat}}^{201} & A_{\text{MeHg}}^{201} & A_{\text{Hg(II)}}^{201} & A_{\text{EtHg}}^{201} \\ A_{\text{nat}}^{202} & A_{\text{MeHg}}^{202} & A_{\text{Hg(II)}}^{202} & A_{\text{EtHg}}^{202} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} X_{\text{nat}} \\ X_{\text{MeHg}} \\ X_{\text{Hg(II)}} \\ X_{\text{EtHg}} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{198} \\ e^{199} \\ e^{200} \\ e^{201} \\ e^{202} \end{bmatrix} \quad (2)$$

The solutions to the three systems of equations are twelve molar fractions (four for each system as described in Equation 2) corresponding to the natural and labelled Hg species in each chromatographic peak that will allow the calculation of the extent of the interconversion reactions and the species concentrations. More details on the calculation procedure and on the development of the mathematical equations are given in the Supporting Information

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Selection of the focused microwave assisted digestion conditions

Optimum digestion conditions must ensure that the endogenous Hg species are completely released from the sample matrix and mixed with the added enriched species in the liquid phase. During this process the identity and concentration of the enriched Hg species must be prevailed to obtain accurate results. Based on previous works¹⁹ we selected TMAH and focused microwaves to perform the digestion of the human samples in a short period of time. Two different microwave programs described previously for Hg speciation using the same system were employed: a constant temperature program at 70°C²⁰ and a fixed power program at 35W with a maximum allowable temperature of 100°C.¹² Both MW programs were applied to the analysis of levels 1 and 4 of SRM 955c (*Caprine blood*), human hair samples, human urine samples and blanks. The interconversion factors obtained in all samples at different digestion conditions are summarized in Table S3 of the Supporting Information which shows a systematic degradation of EtHg and MeHg to Hg(II) under all digestion conditions tested. The dealkylation of EtHg was in all cases higher than that of MeHg. Dealkylation for EtHg ranged from 3 to 74% whereas that for MeHg ranged from 0.2 to 9.2 %. When comparing the different matrices, we observed that the lowest dealkylation factors were obtained when analyzing urine. Indeed, an almost negligible MeHg demethylation was obtained for urine under all digestion conditions tested. EtHg dealkylation was lower than 14% except when performing a room temperature digestion during 2 hours in which we obtained 41% conversion of EtHg into Hg(II). In this case the long digestion time might explain the high dealkylation compared to the values obtained by microwave extraction. EtHg dealkylation was significantly high in hair and blood samples reaching up to 74% when digesting hair at 70°C for 4 minutes. These results confirm that the interconversion between Hg species during sample preparation depends not only on the experimental conditions but also

on the matrix type.²¹ We finally decided to work with a fixed power of 35W during 4.5 minutes as the extraction cycle between samples was faster than when setting a constant temperature in the microwave digester.

3.2. Optimization of the derivatization procedure

The pH, the sample matrix and the added amount of the propylation reagent (NaBPr₄) strongly affect the derivatization yield for the propylation of mercury compounds. For example, De Smaele and coworkers²² reported that NaBPr₄ decomposed under pH 4 leading to an unreactive compound (BPr₃). Indeed, it has been demonstrated that the highest derivatization yield for organomercury species was obtained at pH 4.^{22,23} Providing an exhaustive control of the pH is achieved, it is important to take also into account that different constituents of the biological sample matrix may consume NaBPr₄ before it reacts with the target analytes.²⁴ According to this, different experiments were carried out to optimize the derivatization procedure.

3.2.1. Optimization of the extract volume in blood

Matrix effects during derivatization are more critical in blood samples due to its higher complexity in comparison with hair and urine. Therefore, we selected level 4 of NIST SRM 955c to optimize the extraction procedure. In all cases the digestion of the blood was performed with 4 mL of 25% TMAH; then increasing volumes of the extract, namely 0.5, 1, 2, 3 and the whole extract (ca. 4 mL) were derivatized with a fixed volume of 400 µL of 2% NaBPr₄ in water. Figure 1 shows the interconversion factors obtained for the dealkylation of MeHg and EtHg (%). The rest of interconversion factors were negligible. As can be observed, the highest dealkylation factors are obtained analyzing 1 ml of extract. Assuming an absence of signal drift of the GC-ICP-MS system during the measurement session, a comparison of the derivatization efficiency between samples can be carried out calculating the ratio of the peak area for the isotopes 198, 199, and 201 in EtHg, Hg(II) and MeHg peaks, respectively per ng of added enriched compound. According to the results presented in Figure 1, the lowest dealkylation factors and the higher sensitivity was obtained when derivatizing the total extract volume. Note that error bars in Figure 1 correspond to n=2 independent replicates.

3.2.2. Optimization of the volume of NaBPr₄ in blood and urine

The volume of NaBPr₄ employed for derivatization was optimized for blood and urine. For this purpose, we added increasing volumes of the reagent (from 400 µL to 1 mL) to four replicates of the SRM NIST 955c Level 4 and to four replicates of the same human urine sample. In these cases, the total extract volume was used for derivatization. It is worth noting that each set of data correspond to the same analytical session. The results from different sessions could not be

compared due to the different characteristics of the derivatization reagent in terms of degradation. When NaBPr₄ is stored immediately after dilution it degrades slowly and the reactivity decreases over time affecting the derivatization efficiency and the transformation factors. Due to this fact the experiments were performed with a freshly prepared derivatization reagent. Similarly to the previous results the main interconversions observed were those of EtHg to Hg(II) and MeHg to Hg(II). Figure 2a shows that both interconversion factors increase with the amount of the derivatization reagent. When comparing the peak areas per ng of labelled compound the best sensitivity was obtained using 600 µL of the derivatization reagent but the lowest interconversion was obtained when using 400 µL. When using higher volumes of the derivatizing reagent, the signals decreased significantly. The increment in the volume of derivatization reagent not only caused analyte interconversions, but also other reactions such as analyte reductions to Hg(0). For example, Figure S6 of the Supporting Information shows the GC-ICP-MS chromatograms obtained when adding increasing volumes of NaBPr₄ to the same blood sample (0.5, 1, 2 and 3 mL). As can be observed, the chromatograms showed the formation of a volatile Hg species, most likely Hg(0) due to the short retention time, with a mixed isotopic composition obtained from the reduction of mainly EtHg and Hg(II) by the derivatization reagent. When adding 3 mL of the derivatization reagent the EtHg and Hg(II) peaks disappeared completely from the chromatogram.

The volume of the derivatization reagent was also optimized for the analysis of urine samples. During previous experiments in urine samples we observed similar derivatization yields than those obtained in standards, indicating a very low matrix effect. Therefore, this study was carried out adding volumes of NaBPr₄ from 100 to 400 µL. Figure 2b shows that the interconversion factors in urine were lower than 18% and that the sensitivity obtained was not significantly dependent on the derivatization reagent. The decrease of the sensitivity for Hg(II) when adding 200 µL can be considered as an artefact as similar peak areas per ng of labelled compound were obtained at 100, 300 and 400 µL. Due to the absence of any significant influence, a derivatization volume of 400 µL was selected for future experiments in order to fix the same experimental conditions for blood and urine samples.

3.3. Determination of the blank values in blood and urine analyses

Due to the absence of human samples free of mercury species, the blank values were calculated by Triple Spike IDMS adding proper amounts of ²⁰¹Hg-enriched MeHg, ¹⁹⁹Hg-enriched Hg(II) and ¹⁹⁸Hg-enriched EtHg to blanks. For this purpose, we considered a theoretical sample weight of 0.5 g employed in the previous analyses of SRM 955c and urine samples. We evaluated the contribution to the blank of two potential contamination sources: the disposable glass vials employed during the focused microwave assisted digestion and the use of TMAH. First we analyzed six blanks using precleaned vials with 10% HCl and six brand new non-precleaned vials in the presence of TMAH. Table S.4 shows that there was no significant difference between the

blank values for the three Hg species when using the precleaned vials in comparison with the non-precleaned vials. Thus, we analyzed six additional blanks using non-precleaned vials but removing the digestion reagent TMAH. As can be observed, the blank values for EtHg, MeHg and Hg(II) reduced to negligible levels. So, the extraction reagent was the main contributor to the blanks observed. Although we observed similar blank values with other batches we did not perform any study with different reagent purities. Multiplying by 3 the standard deviation of the blank values obtained using non-precleaned vials, detection limits of 0.11, 0.02 and 0.11 ng Hg g⁻¹ were obtained for Hg(II), MeHg and EtHg, respectively. Figure S7 shows a representative GC-ICP-MS chromatogram of a blank spiked with 0.5 ng of each labeled species.

3.4. Analysis of the certified reference material NIST SRM 955c (Caprine Blood).

The proposed triple spike IDMS methodology was applied to the analysis of Levels 2, 3, and 4 of the SRM 955c (caprine blood). Level 1 was not analyzed because the concentration of the three Hg species was below the method detection limit. We analyzed n=15, 12 and 13 independent replicates for Levels 2, 3 and 4, respectively using at least four different vials of each concentration level. Table 1 shows the average concentration values with associated uncertainties calculated as 1s standard deviation obtained for MeHg, Hg(II), EtHg and the range of the interconversion factors obtained for each level. Tables S5, S6 and S7 in the Supporting Information show the concentrations and the interconversion factors obtained in all individual replicates of Levels 2, 3 and 4, respectively. The total mercury concentration (THg) corresponds to the sum of concentration of the three mercury species. The standard deviation of the THg concentration (SD_{THg}) was calculated using equation (3) where $SD_{Hg(II)}$, SD_{MeHg} and SD_{EtHg} correspond to the standard deviations of the individual concentrations of Hg(II), MeHg and EtHg, respectively.

$$SD_{THg} = \sqrt{[SD_{Hg(II)}]^2 + [SD_{MeHg}]^2 + [SD_{EtHg}]^2} \quad (3)$$

Table 1 shows also that THg values were in good agreement with the certified values reported by NIST in Levels 2, 3 and 4. In addition, the experimental values obtained for Hg(II), MeHg and EtHg in Level 3 were in agreement with the compound-specific certified values. It should be stressed that this work reports for the first time concentrations of MeHg, EtHg and Hg(II) for Levels 2 and 4 of SRM 955c. Typical GC-ICP-MS chromatograms of the three concentration levels are presented in Figure S8 of the Supporting Information. Concerning the interconversion factors, a systematic dealkylation of EtHg and MeHg to form Hg(II) was observed in all replicates. EtHg dealkylation was the most important reaction since the interconversion percentages ranged from 12 to 72% whereas dealkylation of MeHg ranged from 1 to 15%. As mentioned before, the state of the derivatization reagent might explain the high variability found for these factors between different replicates and analytical measurement sessions (see Tables S5, S6 and S7).

Table 1 shows that the rest of interconversion factors were found to be negligible. Relative standard deviations from 3.2 to 16% were obtained reflecting the challenge of quantifying Hg species at the very low ng g^{-1} range in such a complex matrix. This is in agreement with previous works reporting that the correction of analytes interconversion by multiple-spiking isotope dilution is possible at the expense of the precision of the initial amount estimates.²⁵

3.5. Analysis of the certified reference materials IAEA-085 and IAEA-086 (human hair).

Certified human hair reference materials IAEA-085 and IAEA-086 were analyzed by the proposed methodology performing $n=4$ and $n=8$ independent replicates, respectively. Table 1 shows that MeHg and THg values were in good agreement with the certified values. This work also reports for the first time EtHg values for both materials. Preliminary experiments showed that EtHg concentration was lower than 10 ng g^{-1} in IAEA 085 whereas the certified concentration of MeHg was $22.9 \mu\text{g g}^{-1}$. According to Monperrus *et al*⁵ such difference between species concentrations limits the capabilities of multiple spiking approaches and might explain unusual interconversion reactions such as the transalkylation of EtHg into MeHg obtained in IAEA 085 (see Table 1). To avoid anomalous conversion rates in the analysis of IAEA 086, we decided to add similar amounts of labelled EtHg and Hg(II) despite the risk of EtHg overspiking. As can be observed in Table 1, the EtHg dealkylation to form Hg(II), was the most important reaction since the interconversion percentages ranged from 9 to 32% whereas dealkylation of MeHg ranged from 1 to 4%. Table S8, shows the concentrations and the interconversion factors obtained in all individual replicates of hair reference materials IAEA-085 and IAEA-086 and Figure S9 shows typical GC-ICP-MS chromatograms for the analysis of both materials.

3.6. Recovery studies in fortified human urine samples.

Due to the lack of a Certified Reference Material for Hg species in urine we performed recovery experiments in fortified real samples to evaluate the accuracy and precision of the proposed methodology. After collection, urine samples were homogenized, aliquoted and immediately frozen. Thus, precipitation of different compounds in the urine was avoided before the sample preparation procedure and it was possible to analyze the same sample in different measurement sessions. Recovery experiments were performed at three different concentration levels from 1 to 5 ng Hg g^{-1} for each species. Due to the absence of a certified natural abundance standard for EtHg, we characterized the commercial EtHg standard using the same strategy followed to characterize the ^{198}Hg -enriched EtHg standard explained in the Supporting Information. The calculation of the recovery values required the previous determination of the background concentration of the three Hg species in the urine sample. It was observed that the

concentration of Hg(II) was 1.03 ng g^{-1} while those of EtHg and MeHg of the same order of the detection limit of the procedure. Table 1 shows that recovery values from 96.0 to 99.1% were obtained with relative standard deviations from 1.5 to 8%. Table S9 shows the individual theoretical and experimental concentrations and associated recoveries for the fortified real urine samples at 1, 2, 5 ng g^{-1} . The highest relative standard deviations were found for the lowest concentration level and for EtHg determination, similarly than for blood and hair analysis. The use of triple spike isotope dilution is justified also in urine matrices since significant conversions reaching up to 11% from EtHg to Hg(II) were observed. In contrast to hair and blood, dealkylation of MeHg was found to be negligible. Figure S10 shows typical GC-ICP-MS chromatograms of the urine sample fortified at 1, 2, 5 ng g^{-1} .

3.7. Application of the methodology to the analysis of whole human blood samples

The optimized sample preparation conditions were applied to the analysis of real human blood samples. In each measurement session we analyzed Level 2 of NIST SRM 955c for quality control purposes. During the measurement sessions it was found that the intensity of the isotopically labelled compounds was drastically decreased in human blood samples when compared with the reference material under the same extraction and derivatization conditions. Figures 3a and 3b show typical GC-ICP-MS chromatograms of a digested aliquot of SRM 955c caprine blood (Level 2) and a real sample, respectively, using in both cases 0.5 g of sample. As can be observed, although the same amount of labelled compounds was employed in both samples, the intensity of the chromatographic peaks for the isotopic tracers was decreased more than 15 times. According to these results, previous optimized sample preparation conditions for the analysis of SRM 955c might not be adequate for the analysis of every type of whole blood matrix. SRM 955c consists of frozen caprine blood containing spiked inorganic mercury, ethylmercury and methylmercury. Thus, Hg species may not be bonded or incorporated into the same sample constituents as the endogenous compounds in real samples. According to this, an in agreement with previous works¹³, further optimizations of the analytical methodology were carried out with real human blood samples.

Particular effort was then paid to solve this analytical problem as the effect described in Figures 3a and 3b was observed in 24 out of 25 analyzed human blood samples. We modified first the focused microwave conditions to check for an incomplete digestion of the blood samples. Using the same sample of Figure 3 we increased the digestion time from 4.5 minutes to 10 minutes maintaining a fixed power of 35W. As can be observed in Figure S11 we did not observed any increase in the sensitivity for the three Hg species when increasing the digestion time. The next step was to reduce the initial sample amount to check for matrix effects during the derivatization step. Initial amounts of the same sample from 0.1 to 0.5 g were digested and derivatized using the recommended procedure. As can be observed in Figure 4 when using 0.5

g of sample the instrumental sensitivity for the three label species was very low and EtHg dealkylation reached almost 100% whereas that for MeHg into Hg(II) reached 76%. According to the results shown in Figure 4, 0.150 g of sample provided the best intensities for the labelled species and the lowest dealkylation reactions (26% and 3% for EtHg and MeHg dealkylation, respectively). Figure 3 shows the different behavior of NIST SRM 955c compared to real samples. When analyzing 0.150 g of sample the opposite effect is obtained (Figures 3c and 3d) than when using 0.5 g of sample. In any case, results in agreement with the reference values were also obtained for NIST SRM 955c Level 3 with 0.15 g of sample. Finally, using 0.15 g of the same real blood sample we optimized the derivatization reagent volume. Figure S12 shows that, similarly to the analysis of the SRM 955c, when adding a high amount of the derivatization reagent we observed a high suppression of the signal and high conversion rates between species. We finally selected 400 microliters of NaBPr₄ as the volume which provided the lowest interconversion factors (31% and 4.4% for EtHg and MeHg dealkylation into Hg(II), respectively) and an adequate sensitivity for the three Hg species.

4. CONCLUSIONS

This work demonstrates that the accurate determination of Hg species in human samples undoubtedly requires the application of multiple spiking species-specific IDMS. For all matrices and under all samples preparation conditions assayed, we have observed important conversions of MeHg and EtHg into Hg(II) which could not be corrected for using any other calibration technique including single spiking IDMS. We also report for the first time important procedural differences between the analysis of certified reference material SRM 955c and real blood samples. Hg species in real samples are endogenously associated to proteins or other matrix constituents whereas SRM 955c is a fortified caprine blood sample. Using the optimum initial sample amount for the analysis of SRM 955c a severe signal suppression effect is obtained in real samples. In any case, the amount of derivatization reagent NaBPr₄ is critical for species interconversion and has to be specifically optimized for each type of matrix. Indeed, a direct relationship between the quantity added to the sample and the transformation of EtHg and MeHg into Hg(II) that has been systematically observed in all matrices. In addition, when using an excess of NaBPr₄ we have observed the complete reduction of Hg species into Hg(0).

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) through Project 16-TQ2015-70366P is acknowledged. SQA also acknowledges MINECO for the provision of a predoctoral grant BES-2013-062959. This work has been performed within the scope of an EMRP Organisation Research Excellence Grant, awarded in accordance with the EURAMET process to complement the JRP "Traceability for mercury measurements" (ENV51

MeTra). The EMRP is jointly funded by the EMRP participating countries within EURAMET and the European Union.

REFERENCES

- (1) Selin, N. E. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **2009**, *34*, 43–63.
- (2) Clarkson, T. W. *Environ. Health Perspect.* **2000**, *110*, 11–23.
- (3) Halbach, S.; Clarkson, T. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *523*, 522–531.
- (4) Mason R. P.; Reinfelder J. R.; Morel, F. M. M. *Water Air Soil Pollut.*, **1995**, *80*, 915-921.
- (5) Trümpler, S.; Meermann, B.; Nowak, S.; Buscher, W.; Karst, U.; Sperling, M. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2014**, *28*, 125–130.
- (6) Nuttal, K. L. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **2004**, *34*, 235-250.
- (7) Li, M.; Sherman, L. S.; Blum, J. D.; Grandjean, P.; Mikkelsen, B.; Weihe, P.; Sunderland, E. M.; Shine, J. P. *Environ. Sci. Technol.*, **2014**, *48*, 8800–8806.
- (8) Nuttal, K. L. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **2006**, *36*, 248-261.
- (9) Queipo-Abad, S.; Rodríguez-González, P.; García-Alonso, J. I. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **2016**, *36*, 16–21.
- (10) Rahman, G. M. M; Fahrenholz, T.; Kingston, H. M. S. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2009**, *24*, 83-92.
- (11) Laffont, L.; Maurice, L.; Amouroux, D.; Navarro, P.; Monperrus, M.; Sonke, J. E.; Behra, P. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2013**, *405*, 3001–3010.
- (12) Davis, W.C.; Long, S. E. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2011**, *26*, 431–435.
- (13) Sommer, Y. L.; Verdon, C. P.; Fresquez, M. R.; Ward, C. D.; Wood, E. B.; Pan, Y.; Caldwell, K. L.; Jones, R. L. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, *406*, 5039–5047.
- (14) Rahman, G. M. M.; Wolle, M. M.; Fahrenholz, T; Kingston, H. M. S.; Pamuku, M. *Anal. Chem.*, **2014**, *86*, 6130–6137.
- (15) Monperrus, M.; Rodríguez- González, P.; Amouroux, D.; García-Alonso, J.I.; Donard, O. F. X. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, *390*, 655–666.
- (16) Montes Bayon, M.; Gutiérrez Cambor, M.; García-Alonso, J.I.; Sanz-Medel, A. *J. Anal. At. Spectrom.*, **1999**, *14*, 1317–1322.

- (17) Ceulemans, M.; Witte, C.; Lobinski, R.; Adams, F. C. *Appl. Organomet. Chem.*, **1994**, *8*, 451–461.
- (18) Rodríguez-González, P.; Monperrus, M.; García-Alonso, J. I.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2007**, *22*, 1373–1382.
- (19) Davis, W. C.; Christopher, S. J.; Pugh R. S.; Donard, O. F. X.; Krupp; E. A; Point, D; Horvat, M.; Gibičar, D.; Kljakovic-Gaspic, Z.; Porter, B. J.; Schantz, M. M. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, *387*, 2335–2341.
- (20) Pacheco-Arjona, J.; Rodríguez-González, P.; Barclay, D.; Donard, O. F. X. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **2008**, *88*, 923-932.
- (21) Castillo, A.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G.; Roig-Navarro, A. F.; García Alonso, J.I. *Anal. Chem.*, **2010**, *82*, 2773–83.
- (22) De Smaele, T.; Moens, L.; Dams, R.; Sandra, P.; Van Der Eycken, J. *J. Chromatogr. A*, **1998**, *793*, 99–106.
- (23) Monperrus, M.; Tessier, E.; Veschambre, S.; Amouroux, D.; Donard, O. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2005**, *381*, 854–862.
- (24) Berzas Nevado, J. J.; Martín-Doimeadios, R. C. R.; Guzmán Bernardo, F. J.; Jiménez-Moreno, M. *J. Chromatogr. A*, **2005**; *1093*, 21–28.
- (25) Meija, J.; Ouerdane, L.; Mester, Z. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, *394*, 199–205.

TABLES

Table 1. Average concentration values of MeHg, EtHg and Hg(II) and range of interconversion factors obtained in the analysis of Levels 2, 3 and 4 of certified caprine blood NIST SRM 955c, certified human hairs IAEA-085 and IAEA-086 and recovery values in the analysis of human urine fortified at 1, 2 and 5 ng g⁻¹. The range of interconversion factors (%) obtained for each matrix is also given. Uncertainty of the concentration values is expressed as 1s standard deviation of the analyzed replicates.

	Hg(II)	MeHg	EtHg	THg	% MeHg → Hg(II)	% Hg(II) → MeHg	% EtHg → Hg(II)	% Hg(II) → EtHg	% MeHg → EtHg	% EtHg → MeHg
SRM 955c Level 2 n=15	Experimental (ng Hg g ⁻¹)	1.87 ± 0.30	1.40 ± 0.09	5.36 ± 0.46	2.0 → 15	-0.7 → 0.6	29 → 96	-0.6 → 0.2	-0.1 → 0.4	-0.5 → 0.3
	Certified	-	-	4.70 ± 0.72						
SRM 955c Level 3 n=12	Experimental (ng Hg g ⁻¹)	4.77 ± 0.15	3.97 ± 0.40	18.27 ± 0.72	1.6 → 6.5	-0.5 → 0.3	22 → 69	-0.4 → 0.2	-0.3 → 0.2	-0.3 → 0.8
	Certified	4.27 ± 0.95	4.81 ± 0.45	16.91 ± 1.52						
SRM 955c Level 4 n=13	Experimental (ng Hg g ⁻¹)	7.02 ± 0.47	5.90 ± 0.73	33.03 ± 1.42	1.8 → 7.5	-0.9 → 0.2	24 → 72	-0.3 → 1.9	-0.3 → 0.4	-0.9 → 0.5
	Certified	-	-	32.20 ± 1.99						
IAEA-085 n=4	Experimental (µg Hg g ⁻¹)	23.2 ± 0.3	0.01 ± 0.00	24.0 ± 0.3	1.1 → 3.9	-4.7 → 4.5	9.1 → 23	-0.7 → 0.6	0.0 → 0.0	-5.9 → 4.5
	Certified	22.9 ± 1.0	-	23.2 ± 0.8						
IAEA-086 n=8	Experimental (µg Hg g ⁻¹)	0.277 ± 0.006	0.004 ± 0.001	0.558 ± 0.014	1.5 → 3.1	-0.3 → 0.1	12 → 32	-7.0 → 0.1	-0.5 → 0.0	-1.1 → 11
	Certified	0.258 ± 0.022	-	0.573 ± 0.039						
Urine 1 ng g ⁻¹ n=4	Recovery (%)	98.3 ± 1.9	93.8 ± 8.0	--	-1.0 → 0.5	-1.4 → 0.6	6.9 → 11.2	-1.2 → 0.6	-0.6 → 0.3	-1.4 → 0.2
Urine 2 ng g ⁻¹ n=4	Recovery (%)	96.9 ± 1.5	99.1 ± 5.0	--	-0.2 → 0.1	-0.3 → 0.0	5.7 → 7.3	-1.2 → 1.0	-0.3 → 0.0	-0.1 → 0.0
Urine 5 ng g ⁻¹ n=4	Recovery (%)	96.0 ± 1.5	98.1 ± 2.8	--	0.1 → 0.5	-0.5 → 0.0	5.4 → 7.4	-1.0 → 0.2	-0.3 → 0.0	-0.6 → 0.1

FIGURES

Figure 1. Percentages of conversion of MeHg and EtHg into Hg(II) and peak area per added ng of $^{201}\text{MeHg}$, $^{199}\text{Hg(II)}$ and $^{198}\text{EtHg}$ obtained in the analysis of level 4 of NIST SRM 955c when adding 400 μL of NaBPr_4 2% to different volumes of the extract. Error bars correspond to $n=2$ independent replicates analyzed in the same measurement session.

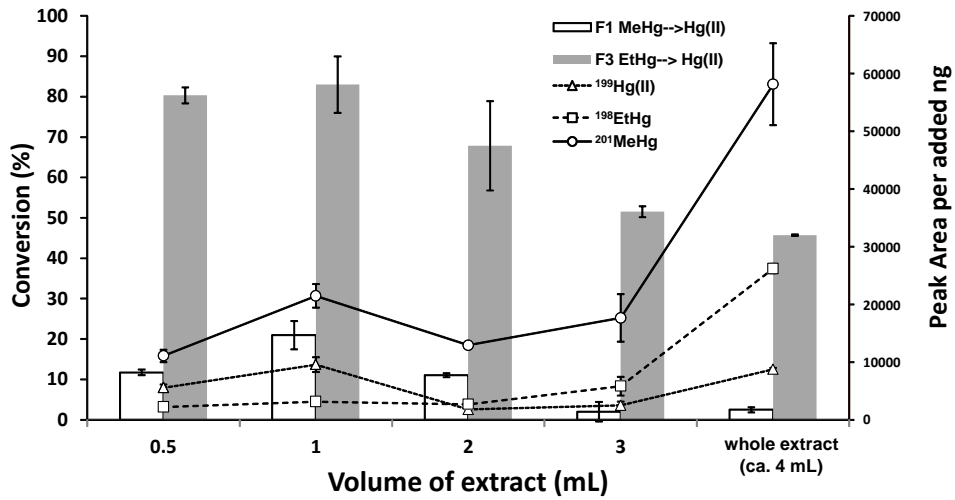


Figure 2. Percentages of conversion of MeHg and EtHg into Hg(II) and peak area per added ng of $^{201}\text{MeHg}$, $^{199}\text{Hg(II)}$ and $^{198}\text{EtHg}$ obtained when adding different volumes of NaBPr_4 in the analysis of a) 4 mL of extract of level 4 of NIST SRM 955c and b) 4 mL of extract of the same human urine sample. Error bars correspond to $n=2$ independent replicates analyzed in the same measurement session.

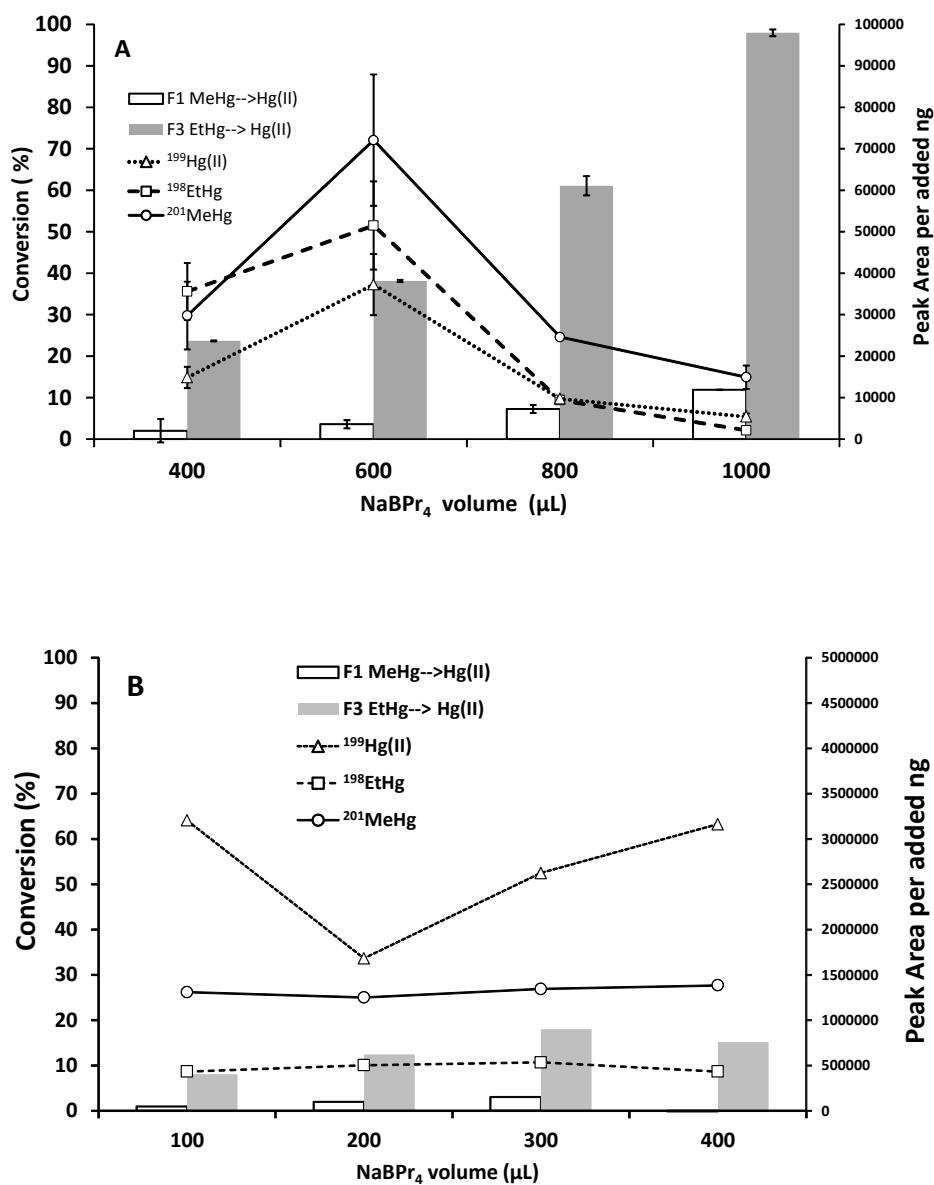


Figure 3. Comparison between the chromatograms obtained for the spiked NIST SRM 955c (*Caprine Blood*) and one spiked human blood sample for different weights taken. Figures A and B correspond to 0.500g of sample for NIST SRM 955c and human blood, respectively. Figures C and D correspond to 0.150 g of sample for NIST SRM 955c and human blood, respectively.

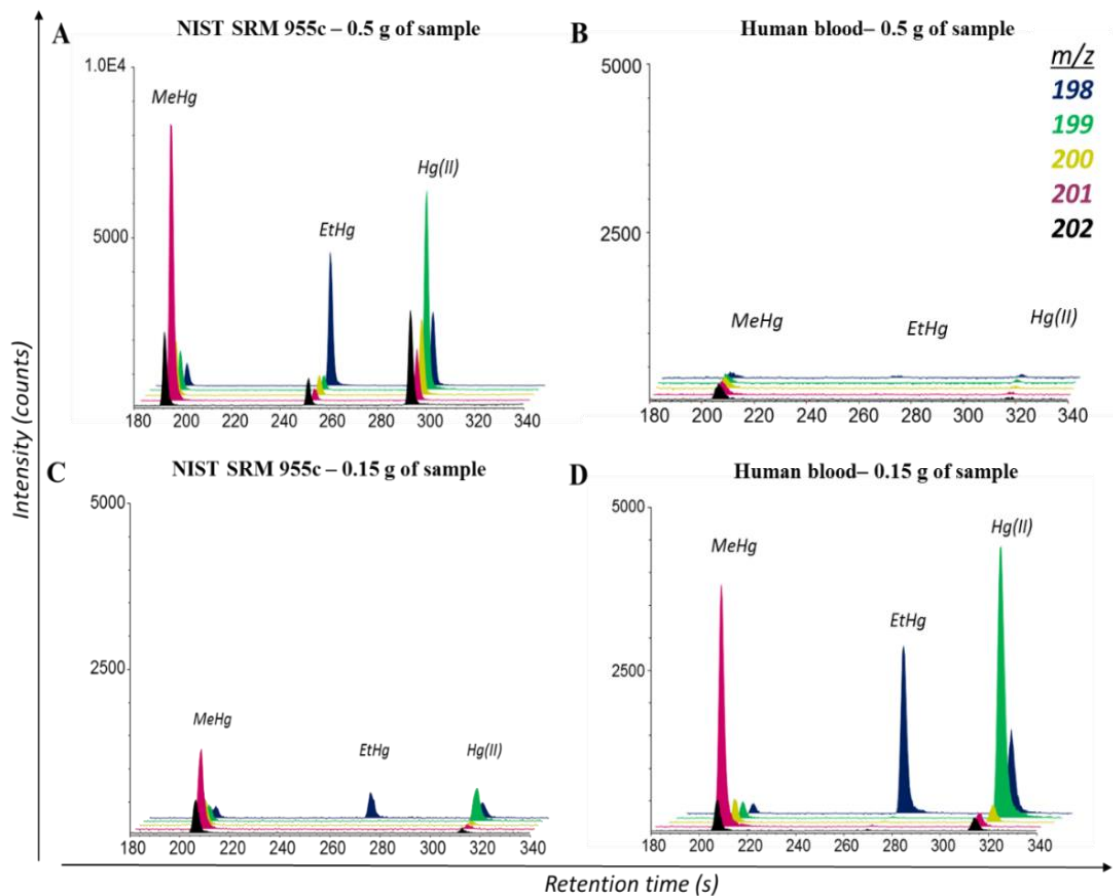
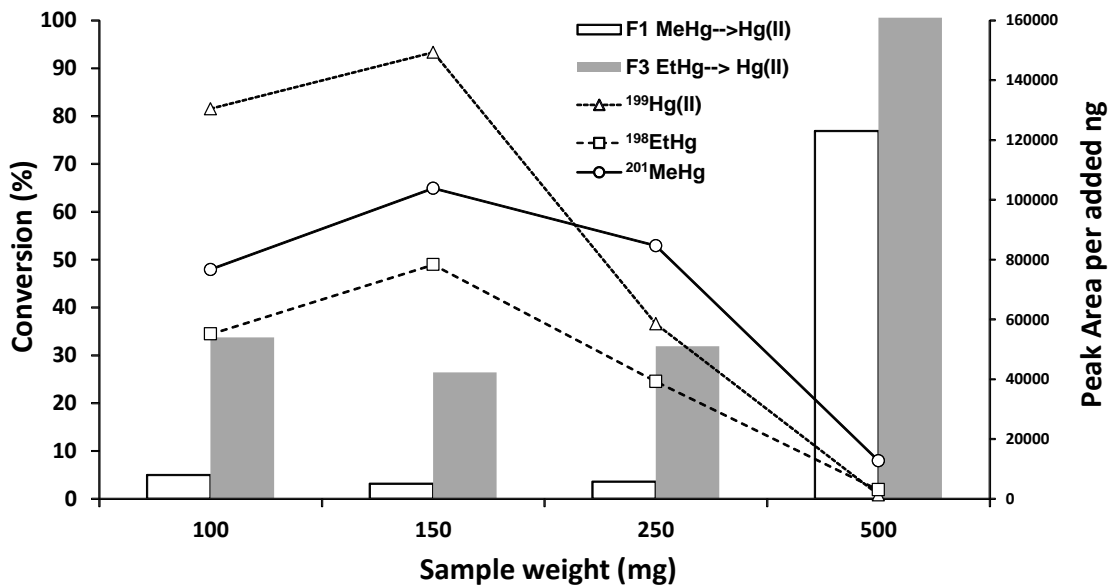


Figure 4. Percentages of conversion of MeHg and EtHg into Hg(II) and peak area per added ng of ²⁰¹MeHg, ¹⁹⁹Hg(II) and ¹⁹⁸EtHg obtained when adding different volumes of NaBPr₄ in the analysis of a human blood sample.



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Development of a Common Procedure for the Determination of Methylmercury, Ethylmercury and Inorganic Mercury in Human Whole Blood, Hair and Urine by Triple Spike Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry

Silvia Queipo Abad[§], Pablo Rodríguez-González^{§*}, W. Clay Davis[†], José Ignacio García Alonso[§]

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

†Chemical Sciences Division, National Institute of Standards and Technology, Charleston, South Carolina 29412, United States

*Author for correspondence: rodriguezpablo@uniovi.es

Instrumentation and GC-ICP-MS parameters

All sample and standards were gravimetrically weighted on an analytical balance Metler Toledo MS Semi-micro MA.205DU (0.0001 g). The pH is adjusted with a Basic 20 CRISON pH-meter (Alella, Barcelona, Spain). The centrifugation of the derivatized samples was performed using a centrifuge model CENTRO-8 BL (JP Selecta, Barcelona, Spain). A Mini-Vap Evaporator (Supelco, Bellefonte PA) was used for the preconcentration of the samples under a nitrogen stream.

Table S1. Instrumental parameters of the GC-ICP-MS system employed.

ICP-MS	Agilent 7500ce
Carrier Gas	1.12 L min ⁻¹
Octapole bias	-16 V
QP Bias	-18 V
Integration time	0.08 s
Acquisition mode	Time resolved analysis
Monitored isotopes	198, 199, 200, 201, 202
GC System	Agilent 6890N
Initial temperature	70°C (1 min)
Ramp rate 1	70-120°C to 40°C min ⁻¹
Ramp rate 2	120-150°C to 10°C min ⁻¹
Ramp rate 3	150-250°C to 40°C min ⁻¹
Final temperature	250°C (1 min)
Acquisition time	6 min
Interface temperature	275°C
Injector temperature	250°C
Volume of injection	2 µL

Reagents

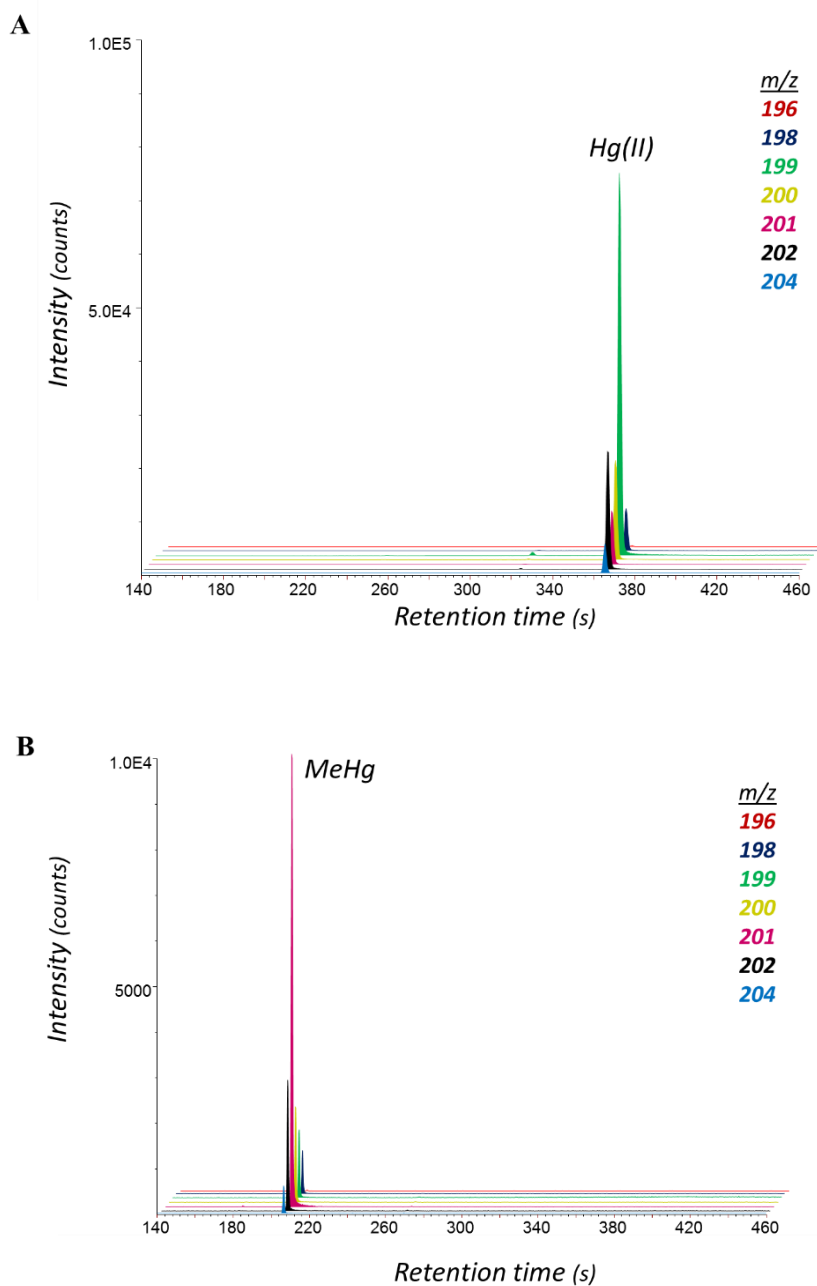
Standards of natural abundance for MeHg, EtHg and Hg(II) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Diluted working solutions for organomercury compounds were prepared using a 3:1 mixture of acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) and methanol (Sigma-Aldrich,) and were kept in the dark at -18°C until analysis. Dilutions of ¹⁹⁹Hg-enriched Hg(II) and natural abundance Hg(II) were performed with 2% sub-boiled HCl in Milli-Q water ($\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). Digestions of the samples were performed with 25% tetramethylammonium hydroxide (TMAH) (Sigma-Aldrich). An acetic acid/sodium acetate buffer was prepared by dissolving sodium acetate (Sigma-Aldrich) in Milli-Q water and adjusted to pH 4 with sub-boiled HCl 10% (Sigma-Aldrich). The clean-up of the organic layer, after extraction, was carried out with Florisil® (Sigma-Aldrich). PTFE-coated magnetic stirring bars and disposal glass vessels employed for the focused microwave digestions were purchased from CEM Corporation. Propylation of mercury compounds was performed using a 2% (w/v) solution of sodium (tetra-n-propyl)borate (LGC-Standards, Wesel, Germany) in Milli-Q water. Hexane (Sigma-Aldrich) was employed for the extraction of the derivatized mercury compounds.

Characterization of the isotopically enriched compounds

²⁰¹MeHg and ¹⁹⁹Hg(II) enriched solutions

The characterization of the ²⁰¹MeHg and ¹⁹⁹Hg(II) solutions was performed by reverse IDMS using natural abundance certified standards. For each compound the seven stable isotopes of mercury were measured by GC-ICP-MS. The obtained isotopic composition and concentration of each compound is given in Table S2. The isotopic enrichment obtained for ²⁰¹MeHg and ¹⁹⁹Hg(II) was $96.1 \pm 0.01 \%$ and $89.9 \pm 0.07 \%$, respectively. Figure S1 shows typical GC-ICP-MS chromatograms of a reverse IDMS mixture of natural and labelled analogue for both tracers.

Figure S1. Representative GC-ICP-MS chromatograms of a reverse IDMS mixture of A) natural abundance Hg(II) and $^{199}\text{Hg}(\text{II})$ and B) natural abundance MeHg and $^{201}\text{MeHg}$.

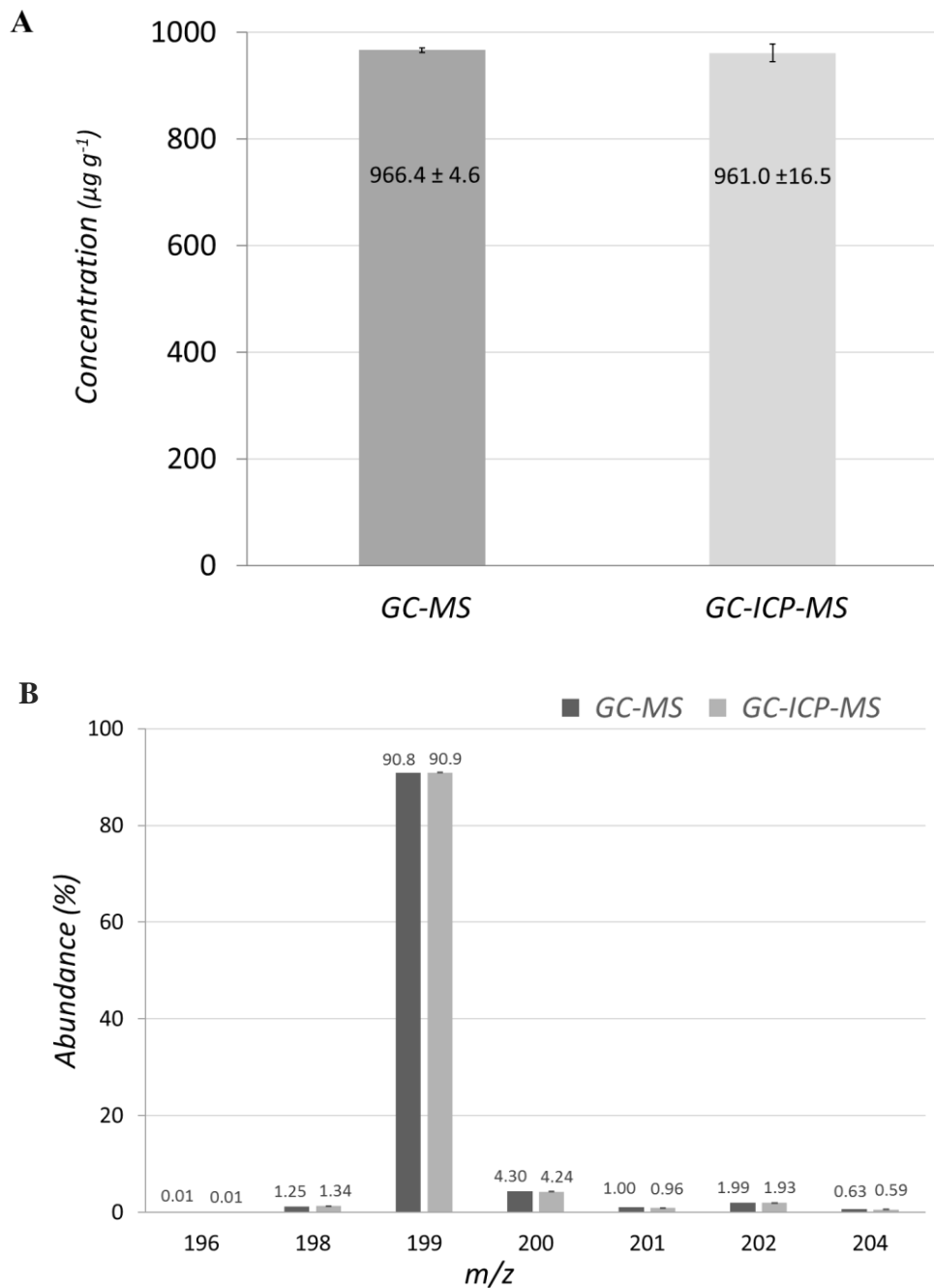


$^{198}\text{EtHg}$ enriched solution

Due to the lack of a commercially available certified natural abundance standard of EtHg, the quantification of the $^{198}\text{EtHg}$ solution was accomplished using a different strategy. We determined first by conventional nebulization the total Hg content in the $^{198}\text{EtHg}$ solution using $^{199}\text{Hg}(\text{II})$ as spike. For this purpose, the previous characterization of the $^{199}\text{Hg}(\text{II})$ by GC-ICP-MS

was validated by GC-EI-MS. Figure S2 shows that both techniques provide the same values both for the concentration and for the isotopic composition of the $^{199}\text{Hg}(\text{II})$ solution. The determination of the total Hg concentration in the $^{198}\text{EtHg}$ solution was performed in two different sessions, with no significant variations (4.59 ± 0.13 and 4.66 ± 0.14).

Figure S2. A) Concentration of ^{199}Hg -enriched Hg(II) obtained by reverse IDMS using GC-ICP-MS and GC-MS. B) Isotopic abundances of ^{199}Hg -enriched Hg(II) obtained by GC-MS and GC-ICP-MS.



Then, the impurities of MeHg and Hg(II) present in the solution were determined by GC-ICP-MS using $^{201}\text{MeHg}$ and $^{199}\text{Hg(II)}$, respectively (Figures S3 and S4). To determine the accurate concentration of $^{198}\text{EtHg}$, both impurities were subtracted from the previously calculated total Hg value assuming that the only contribution to total Hg was due to Hg(II), MeHg and EtHg. The concentration showed in Table S.2 corresponds to the mean value of the two different determinations of total mercury after subtraction of the concentrations corresponding to $^{198}\text{MeHg}$ and $^{198}\text{Hg(II)}$.

Figure S3. Representative GC-ICP-MS chromatogram for the determination of MeHg impurity in the spike solution of $^{198}\text{EtHg}$ adding $^{201}\text{MeHg}$ as analytical tracer.

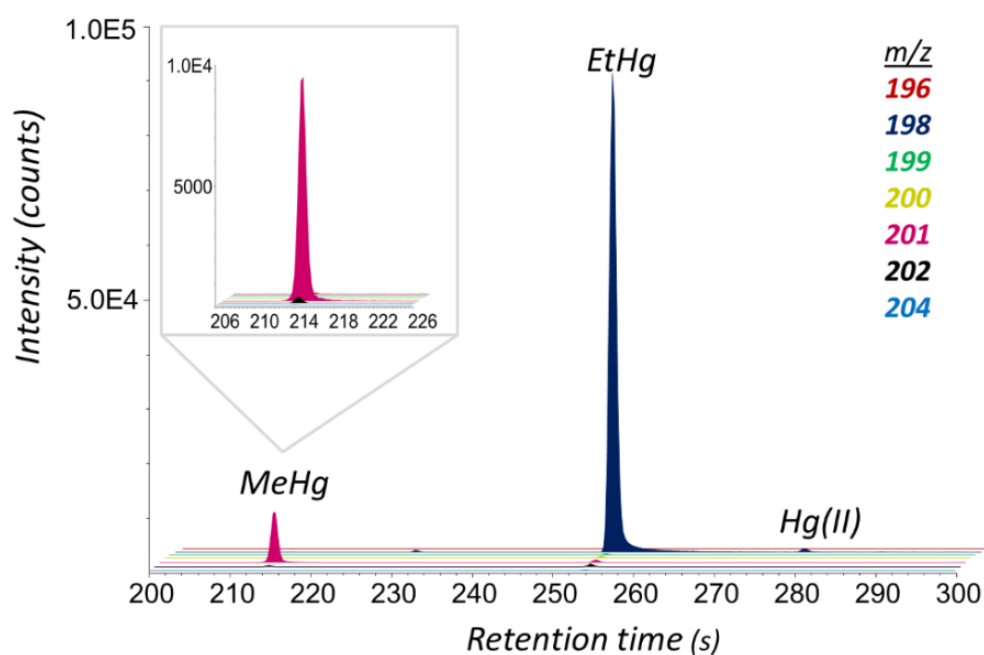


Figure S4. Representative GC-ICP-MS chromatogram for the determination of Hg(II) impurity in the spike solution of $^{198}\text{EtHg}$ adding $^{199}\text{Hg(II)}$ as analytical tracer.

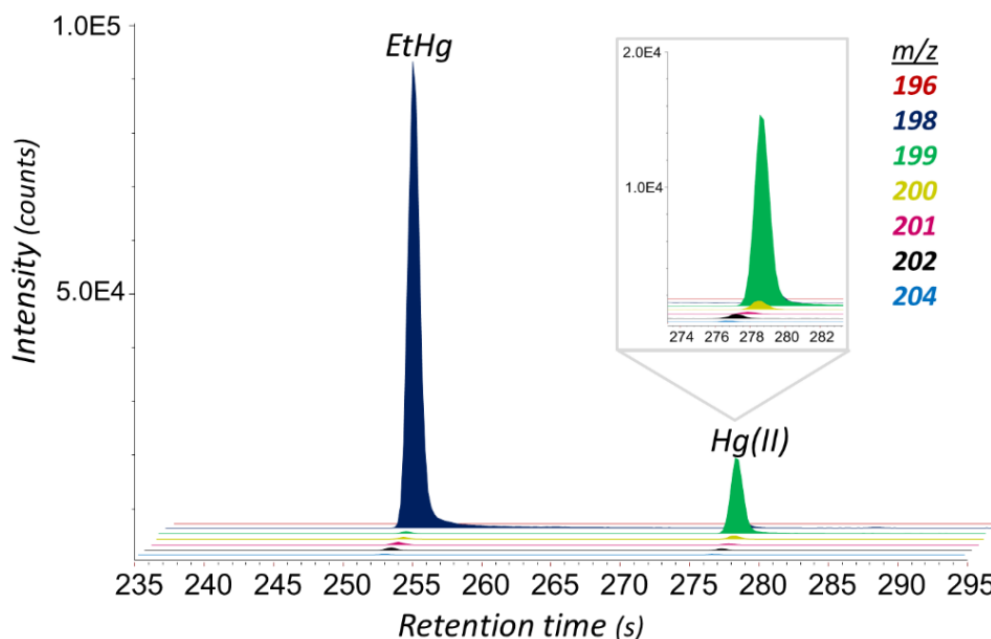
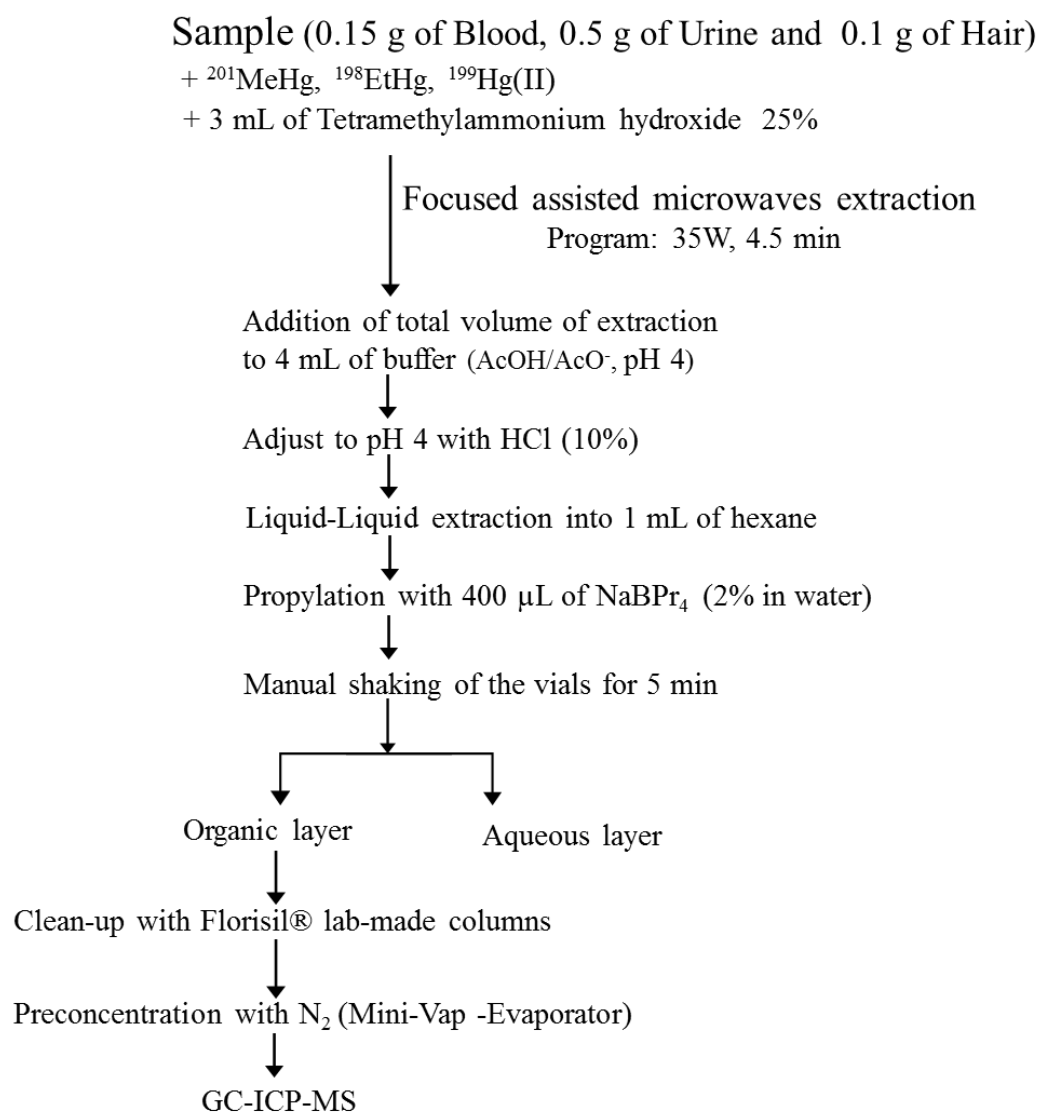


Table S2. Concentration ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$) and isotope abundances of the isotopically enriched $^{201}\text{MeHg}$, $^{199}\text{Hg(II)}$ and $^{198}\text{EtHg}$ solutions employed in this work. Uncertainty of the concentration values corresponds to $n=3$ independent replicates whereas the uncertainty of the isotope abundance values corresponds to $n=3$ independent GC-ICP-MS injections.

$\mu\text{g Hg g}^{-1}$	$^{201}\text{MeHg}$ GC-ICP-MS	$^{199}\text{Hg(II)}$ GC-ICP-MS	$^{198}\text{EtHg}$ Neb-ICP-MS
Concentration	5.10 ± 0.05	9.40 ± 0.16	4.57 ± 0.05
Impurity of MeHg	-	-	0.003 ± 0.001
Impurity of EtHg	-	-	-
Impurity of Hg(II)	-	-	0.05 ± 0.02
Isotope	Abundances		
196	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.19 ± 0.01
198	0.06 ± 0.01	1.34 ± 0.02	98.20 ± 0.02
199	0.13 ± 0.00	90.92 ± 0.02	0.22 ± 0.01
200	1.01 ± 0.01	4.24 ± 0.06	0.37 ± 0.02
201	96.1 ± 0.01	0.96 ± 0.01	0.43 ± 0.01
202	2.65 ± 0.01	1.93 ± 0.04	0.50 ± 0.01
204	0.11 ± 0.00	0.59 ± 0.01	0.10 ± 0.00

Sample preparation procedure

Figure S5. Schematic representation of the sample preparation procedure for the determination of MeHg, EtHg and Hg(II) in human whole blood, urine and hair.



Triple Spike Isotope Dilution Equations

The correction of the transformations is performed by the determination of the six possible transformation factors. The calculation is obtained from a system of equations developed from the amount balances of each compound in the mixture of isotope dilution. We consider the

contribution of the different components added to the mixture. In addition, impurities found in each enriched solution must be also considered:

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

$$N_m^{MeHg} = (N_{nat}^{MeHg} + N_{tHg(II)}^{MeHg} + N_{tMeHg}^{MeHg} + N_{tEtHg}^{MeHg})(1 - F2 - F4) + (N_{nat}^{Hg(II)} + N_{tHg(II)}^{Hg(II)} + N_{tMeHg}^{Hg(II)} + N_{tEtHg}^{Hg(II)})F1 + (N_{nat}^{EtHg} + N_{tHg(II)}^{EtHg} + N_{tMeHg}^{EtHg} + N_{tEtHg}^{EtHg})F6 \quad (Eq. S.2)$$

$$N_m^{EtHg} = (N_{nat}^{EtHg} + N_{tHg(II)}^{EtHg} + N_{tMeHg}^{EtHg} + N_{tEtHg}^{EtHg})(1 - F3 - F6) + (N_{nat}^{Hg(II)} + N_{tHg(II)}^{Hg(II)} + N_{tMeHg}^{Hg(II)} + N_{tEtHg}^{Hg(II)})F4 + (N_{nat}^{MeHg} + N_{tHg(II)}^{MeHg} + N_{tMeHg}^{MeHg} + N_{tEtHg}^{MeHg})F5 \quad (Eq. S.3)$$

For this equations N is the number of mols, m is the mixture, nat is the sample with natural abundance and tHg, tEtHg and tMeHg are the three different tracers. Using the molar fractions obtained as described in equation 1 we can define the following set of equations:

$$X_{nat}^{Hg(II)} N_m^{Hg(II)} = N_{nat}^{Hg(II)}(1 - F2 - F4) + N_{nat}^{MeHg}F1 + N_{nat}^{EtHg}F3 \quad (Eq. S.4)$$

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

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

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

$$X_{nat}^{MeHg} N_m^{MeHg} = N_{nat}^{MeHg}(1 - F1 - F5) + N_{nat}^{Hg(II)}F2 + N_{nat}^{EtHg}F6 \quad (Eq. S.8)$$

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

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

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

$$X_{nat}^{EtHg} N_m^{EtHg} = N_{nat}^{EtHg} (1 - F3 - F6) + N_{nat}^{Hg(II)} F4 + N_{nat}^{MeHg} F5 \quad (Eq. S.12)$$

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

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

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

The factors of conversion can be obtained by ratiating these equations in order to develop a system of six equations with six unknowns. The system can be computed by dividing equations S.4 by S.5, S.8 by S.10 and S.12 by S.15 as follows:

$$\begin{aligned} & (X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tMeHg}^{MeHg} - X_{tMeHg}^{Hg(II)} N_{tHg}^{MeHg}) F1 + (X_{tMeHg}^{Hg(II)} N_{tHg(II)}^{Hg(II)} - X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tMeHg}^{Hg(II)}) F2 + (X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tMeHg}^{EtHg} - \\ & X_{tMeHg}^{Hg} N_{tHg}^{EtHg}) F3 + (X_{tMeHg}^{Hg(II)} N_{tHg(II)}^{Hg(II)} - X_{tHg}^{Hg} N_{tMeHg}^{Hg}) F4 + (X_{tHg(II)}^{Hg(II)} N_{tMeHg}^{Hg(II)} - X_{tMeHg}^{Hg} N_{tHg}^{Hg}) = 0 \end{aligned} \quad (Eq.S.16)$$

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

$$\begin{aligned} & (X_{tMeHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{MeHg} - X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tMeHg}^{MeHg}) F1 + (X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tMeHg}^{Hg(II)} - X_{tMeHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{Hg(II)}) F2 + (X_{tMeHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{MeHg} - \\ & X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tMeHg}^{MeHg}) F5 + (X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tMeHg}^{EtHg} - X_{tMeHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{EtHg}) F6 + (X_{tHg(II)}^{MeHg} N_{tEtHg}^{MeHg} - X_{tEtHg}^{MeHg} N_{tHg(II)}^{MeHg}) = 0 \end{aligned} \quad (Eq.S.18)$$

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

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

(Eq. S.20)

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

(Eq.S.21)

Equations S.16 to S.21 constitute a system of equations in which the unknowns are the six factors F1 to F6.

Once we determine the transformation factors F1 to F6, the next step is the calculation of the endogenous amounts in the mixture. For this purpose, we can build another system of three equations and three unknowns dividing equations S.3 by S.4, S.7 by S.9 and S.11 by S.14:

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

(Eq.S.22)

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

(Eq.S.23)

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

(Eq.S.24)

The results for this matrix are the endogenous number of mols of each species in the sample, already corrected for any species interconversion.

Table S3. Interconversion factors obtained in the analysis of different sample matrices under different digestion conditions using TMAH and focused microwaves. Data for the blanks and blood samples (Level 1 and Level 4 of NIST SRM 955c) correspond to the same analytical session.

Matrix	MW program	F1 MeHg → Hg(II)	F2 Hg(II) → MeHg	F3 EtHg → Hg(II)	F4 Hg(II) → EtHg	F5 MeHg → EtHg	F6 EtHg → MeHg
Blank (no matrix)	35 W, 4.5 min	4.3	-0.1	20	0.1	0.1	0.0
	70°C, 4 min	3.8	-0.2	18	0.0	0.1	-0.1
Level 1 SRM 955c	35 W, 4.5 min	9.2	-0.5	39	-0.5	-0.1	0.5
	70°C, 4 min	14	-1.7	39	-0.4	-0.1	0.2
Level 4 SRM 955c	35 W, 4.5 min	7.5	-0.9	41	1.9	0.0	-0.9
	70°C, 4 min	5.0	-0.6	35	0.2	-0.3	-0.1
Real hair sample	35 W, 4.5 min	3.9	1.3	24	-3.0	-0.2	1.4
	35 W, 2 min	4.0	0.5	37	-1.9	-0.1	1.0
	70°C, 4 min	6.0	-0.5	74	-1.0	-0.1	-0.1
	70°C, 2 min	3.4	-1.0	42	-2.1	-0.1	-0.4
	80°C, 4 min	9.2	-1.4	60	-1.6	-0.1	-1.4
	80°C, 2 min	4.0	0.1	34	-2.3	-0.2	0.2
Real urine sample	35 W, 4.5 min	0.2	-0.2	14	0.2	0.0	-0.1
	35 W, 2 min	0.2	-0.2	3.0	0.2	-0.1	-0.1
	70°C, 4 min	0.5	-0.2	13	0.2	0.0	-0.2
	70°C, 2 min	0.2	-0.1	3.3	0.2	0.0	-0.1
	Room T (no MW)	0.9	-0.1	41	0.2	0.0	-0.1

Figure S6. GC-ICP-MS chromatograms obtained when adding (a) 500 μL ; (b) 1000 μL ; (c) 2000 μL and (d) 3000 μL of a 2% solution of NaBPr_4 to 4 mL of extract of caprine blood SRM 955c.

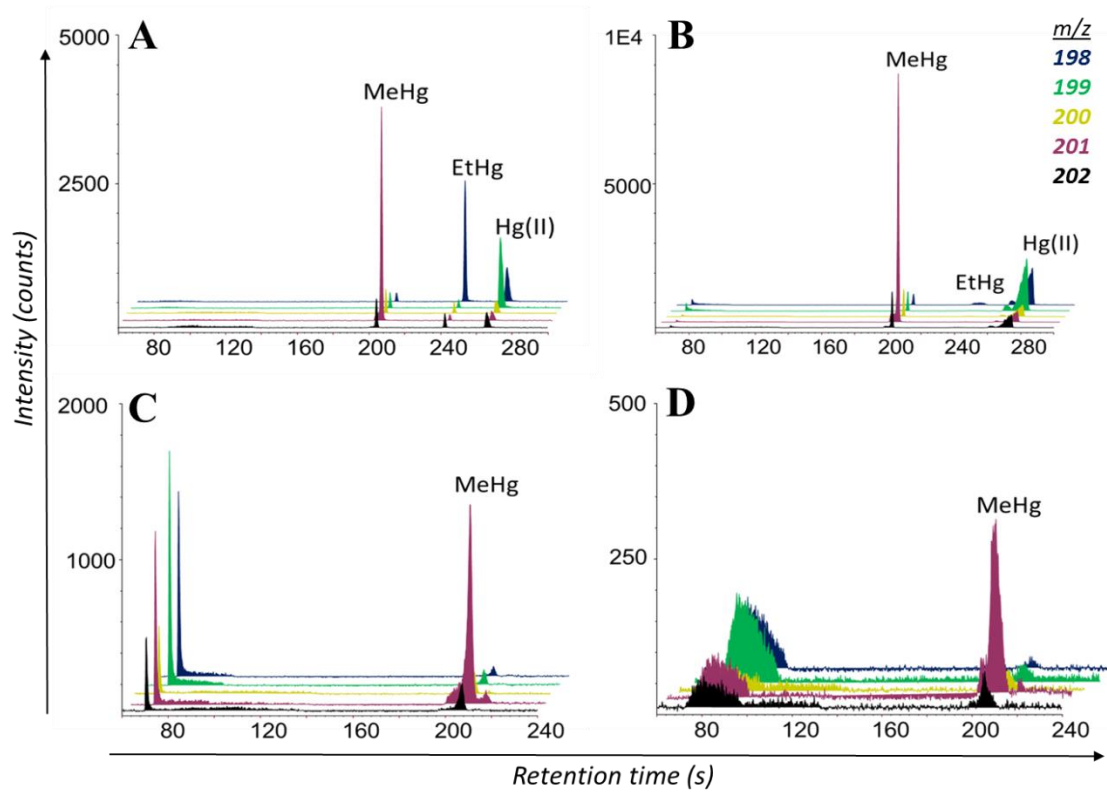


Table S4. Blank values (ng Hg g⁻¹) obtained under different sample preparation conditions considering a sample amount of 0.5g.

<i>Replicate</i>	<i>Precleaned Vials</i>	<i>TMAH</i>	<i>Hg(II) (ng Hg g⁻¹)</i>	<i>MeHg (ng Hg g⁻¹)</i>	<i>EtHg (ng Hg g⁻¹)</i>
B.1	Yes	Added	0.12	0.06	0.21
B.2			0.11	0.06	0.22
B.3			0.09	0.07	0.22
B.4			0.11	0.07	0.22
B.5			0.10	0.06	0.21
B.6			0.09	0.06	0.19
Average ± SD			0.10 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.21 ± 0.01
B.7	No	Added	0.10	0.05	0.12
B.8			0.09	0.05	0.18
B.9			0.19	0.06	0.20
B.10			0.14	0.06	0.21
B.11			0.17	0.05	0.20
B.12			0.13	0.06	0.22
Average ± SD			0.14 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.19 ± 0.04
B.13	No	Not added	-0,02	-0,01	0,01
B.14			0,00	-0,01	0,01
B.15			-0,01	-0,01	0,00
B.16			-0,02	-0,04	0,01
B.17			-0,01	-0,01	0,01
B.18			-0,03	-0,01	0,01
Average ± SD			-0.02 ± 0.01	-0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00

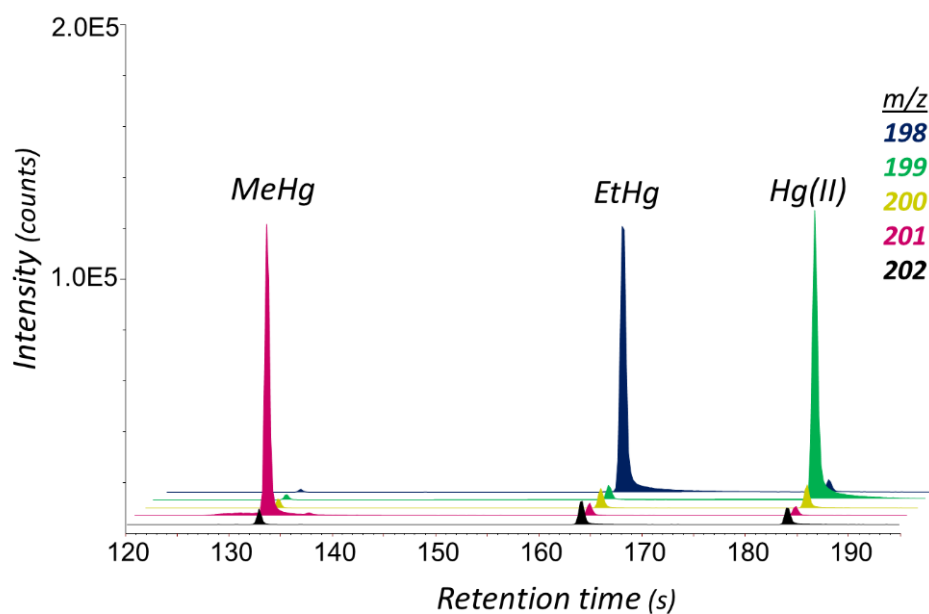
Figure S7. Representative GC-ICP-MS chromatogram of a blank spiked with 0.5 ng of each labelled species (²⁰¹MeHg, ¹⁹⁸EtHg and ¹⁹⁹Hg(II)).

Table S5. Average concentration values ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$) of MeHg, Hg(II) and interconversion factors obtained for 15 independent replicates of Level 2 of SRM 955c (Caprine Blood). Uncertainties are expressed as 1s standard deviation of the injections performed in each case.

NIST SRM 955c Level 2 (Caprine Blood)												
Replicate	Number of injections	Hg(II)	MeHg	EtHg	THg	% MeHg→Hg(II)	Hg(II)→MeHg	% EtHg→Hg(II)	Hg(II)→EtHg	% MeHg→EtHg	EtHg→MeHg	%
1	3	2.04 ± 0.50	1.66 ± 0.04	1.58 ± 0.18	5.27 ± 0.53	14.66 ± 1.16	-0.14 ± 0.16	96.46 ± 0.96	-0.02 ± 0.03	0.03 ± 0.07	-0.08 ± 0.10	
2	2	2.50 ± 0.09	1.69 ± 0.08	1.32 ± 0.01	5.50 ± 0.12	5.69 ± 0.33	0.23 ± 0.36	70.12 ± 0.89	-0.12 ± 0.19	0.00 ± 0.12	0.19 ± 0.61	
3	2	2.53 ± 0.21	1.69 ± 0.01	1.33 ± 0.01	5.54 ± 0.21	3.27 ± 0.57	-0.67 ± 0.35	44.26 ± 3.24	-0.02 ± 3.31	0.19 ± 0.26	-0.45 ± 0.11	
4	2	2.60 ± 0.30	1.80 ± 0.02	1.28 ± 0.07	5.68 ± 0.31	3.73 ± 0.89	-0.04 ± 0.31	47.24 ± 2.42	-0.18 ± 2.60	0.40 ± 0.05	0.23 ± 0.24	
5	3	1.70 ± 0.27	1.62 ± 0.00	1.38 ± 0.04	4.70 ± 0.27	4.41 ± 0.28	0.15 ± 0.24	58.56 ± 1.33	0.08 ± 0.05	-0.05 ± 0.05	-0.08 ± 0.13	
6	3	1.76 ± 0.26	1.59 ± 0.02	1.46 ± 0.12	4.81 ± 0.29	5.25 ± 0.56	-0.10 ± 0.15	64.65 ± 3.44	0.01 ± 0.06	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.14	
7	3	1.61 ± 0.19	1.49 ± 0.05	1.41 ± 0.05	4.52 ± 0.20	5.49 ± 0.09	-0.14 ± 0.11	83.70 ± 1.57	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.02	-0.11 ± 0.11	
8	3	1.83 ± 0.20	1.62 ± 0.09	1.31 ± 0.03	4.76 ± 0.22	3.84 ± 0.56	-0.21 ± 0.37	54.63 ± 0.80	-0.00 ± 0.05	-0.00 ± 0.11	-0.36 ± 0.12	
9	3	1.56 ± 0.24	1.84 ± 0.01	1.46 ± 0.14	4.87 ± 0.28	3.39 ± 0.19	-0.16 ± 0.19	28.75 ± 0.78	0.22 ± 0.03	0.05 ± 0.13	-0.11 ± 0.13	
10	3	2.27 ± 0.41	2.18 ± 0.04	1.37 ± 0.13	5.81 ± 0.44	3.27 ± 1.24	-0.33 ± 1.03	54.39 ± 1.73	0.22 ± 0.13	0.16 ± 0.23	-0.10 ± 0.56	
11	3	2.16 ± 0.12	2.63 ± 0.05	1.44 ± 0.11	6.22 ± 0.17	3.74 ± 0.60	-0.11 ± 0.14	55.59 ± 2.11	-0.33 ± 0.17	0.23 ± 0.27	-0.20 ± 0.18	
12	3	2.23 ± 0.29	1.94 ± 0.01	1.42 ± 0.18	5.59 ± 0.34	2.03 ± 0.71	0.56 ± 0.78	44.66 ± 0.46	-0.12 ± 0.89	0.23 ± 0.41	0.28 ± 0.76	
13	3	2.10 ± 0.07	1.99 ± 0.06	1.54 ± 0.09	5.64 ± 0.13	3.11 ± 0.61	-0.63 ± 0.34	45.87 ± 0.58	-0.66 ± 0.38	0.39 ± 0.11	-0.33 ± 0.41	
14	2	2.24 ± 0.00	2.21 ± 0.01	1.47 ± 0.02	5.93 ± 0.03	4.10 ± 0.76	0.31 ± 0.50	45.57 ± 0.69	-0.57 ± 0.18	-0.12 ± 0.24	0.02 ± 0.27	
15	2	2.19 ± 0.15	2.04 ± 0.02	1.28 ± 0.06	5.51 ± 0.07	4.57 ± 0.12	-0.14 ± 0.30	58.65 ± 0.27	-0.51 ± 0.05	0.29 ± 0.32	0.04 ± 0.19	
Mean		2.09 ± 0.33	1.87 ± 0.30	1.40 ± 0.09	5.36 ± 0.46	4.70 ± 2.92	-0.09 ± 0.32	56.87 ± 16.87	-0.12 ± 0.27	0.12 ± 0.16	-0.07 ± 0.21	
Certified values		-	-	-	4.70 ± 0.72							

Table S6. Average concentration values ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$) of MeHg, Hg(II) and interconversion factors obtained for 12 independent replicates of Level 3 of SRM 955c (Caprine Blood). Uncertainties expressed as 1s standard deviation of the injections performed in each case.

NIST SRM 955c Level 3 (Caprine Blood)												
Replicate	Number of injections	Hg(II)	MeHg	EtHg	THg	MeHg→Hg(II)	Hg(II)→MeHg	EtHg→Hg(II)	Hg(II)→EtHg	MeHg→EtHg	EtHg→MeHg	%
1	2	9.25 ± 0.28	4.93 ± 0.33	4.78 ± 0.84	18.96 ± 0.94	1.57 ± 0.66	-0.01 ± 1.64	32.75 ± 1.03	-0.06 ± 0.17	-0.29 ± 0.60	0.75 ± 0.96	
2	2	8.62 ± 0.19	4.51 ± 0.00	3.63 ± 0.01	16.76 ± 0.19	3.14 ± 0.89	-0.49 ± 1.44	29.65 ± 0.73	0.16 ± 0.19	0.09 ± 0.23	-0.30 ± 1.51	
3	1	10.29	4.84	4.44	19.57	2.85	0.28	38.32	-0.08	-0.11	0.20	
4	3	10.53 ± 0.56	4.66 ± 0.12	4.11 ± 0.16	19.30 ± 0.59	3.97 ± 0.63	0.18 ± 0.44	27.30 ± 4.21	0.02 ± 0.07	0.16 ± 0.36	0.08 ± 0.56	
5	3	9.38 ± 0.87	4.82 ± 0.22	3.84 ± 0.38	18.04 ± 0.97	3.35 ± 0.25	-0.36 ± 0.23	32.84 ± 1.71	0.07 ± 0.14	-0.09 ± 0.14	0.04 ± 0.41	
6	3	8.86 ± 0.52	4.77 ± 0.19	3.64 ± 0.05	18.45 ± 0.16	3.14 ± 0.53	0.24 ± 0.08	42.10 ± 0.98	0.09 ± 0.05	0.07 ± 0.14	0.11 ± 0.18	
7	3	9.64 ± 0.93	5.05 ± 0.31	4.19 ± 0.22	18.88 ± 1.00	2.82 ± 0.34	0.08 ± 0.18	30.10 ± 6.87	-0.04 ± 0.06	-0.05 ± 0.06	0.19 ± 0.09	
8	3	9.78 ± 0.24	4.75 ± 0.17	3.81 ± 0.08	18.35 ± 0.31	2.88 ± 0.77	0.19 ± 0.15	25.69 ± 0.10	0.02 ± 0.04	0.03 ± 0.18	0.21 ± 0.19	
9	1	8.90	4.74	4.33	17.97	3.80	-0.37	29.94	-0.42	-0.08	-0.29	
10	2	9.88 ± 0.83	4.57 ± 0.12	3.47 ± 0.10	17.91 ± 0.81	2.62 ± 0.74	0.09 ± 0.39	21.55 ± 0.96	0.14 ± 0.31	-0.14 ± 0.31	-0.12 ± 0.13	
11	3	9.69 ± 0.04	4.92 ± 0.02	3.76 ± 0.10	18.37 ± 0.10	6.49 ± 0.16	-0.07 ± 0.27	68.55 ± 0.74	-0.04 ± 0.06	0.03 ± 0.13	0.21 ± 0.16	
12	3	9.60 ± 0.12	4.74 ± 0.07	3.58 ± 0.06	17.92 ± 0.16	3.48 ± 0.94	-0.20 ± 0.26	49.59 ± 1.31	-0.03 ± 0.05	-0.08 ± 0.30	-0.17 ± 0.47	
Mean		9.53 ± 0.57	4.77 ± 0.15	3.97 ± 0.40	18.27 ± 0.72	3.34 ± 0.94	-0.04 ± 0.26	35.70 ± 12.82	-0.01 ± 0.15	-0.04 ± 0.12	0.07 ± 0.29	

Table S7. Average concentration values ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$) of MeHg, Hg(II) and interconversion factors obtained for 13 independent replicates of Level 4 of SRM 955c (Caprine Blood). Uncertainties are expressed as 1s standard deviation of the injections performed in each case.

NIST SRM 955c Level 4 (Caprine Blood)																	
Replicate	Number of injections	Hg(II)	MeHg	EtHg	THg	MeHg \rightarrow Hg(II)	%	Hg(II) \rightarrow MeHg	%	EtHg \rightarrow Hg(II)	%	Hg(II) \rightarrow EtHg	%	MeHg \rightarrow EtHg	%	EtHg \rightarrow MeHg	%
1	2	21.23 \pm 0.51	7.33 \pm 0.55	7.42 \pm 0.25	35.98 \pm 0.79	4.96 \pm 3.35	-0.64 \pm 0.15	-0.64 \pm 0.15	34.77 \pm 1.29	0.16 \pm 0.34	-0.27 \pm 0.04	-0.27 \pm 0.04	-0.27 \pm 0.04	-0.27 \pm 0.04	-0.27 \pm 0.04	-0.06 \pm 0.35	-0.06 \pm 0.35
2	2	18.69 \pm 1.56	7.59 \pm 0.68	7.31 \pm 1.03	33.59 \pm 1.99	7.53 \pm 4.69	-0.89 \pm 1.09	-0.89 \pm 1.09	40.54 \pm 9.65	1.93 \pm 2.59	0.04 \pm 1.02	0.04 \pm 1.02	0.04 \pm 1.02	0.04 \pm 1.02	0.04 \pm 1.02	-0.91 \pm 0.35	-0.91 \pm 0.35
3	1	19.34	7.18	5.83	32.35	2.67	-0.01	-0.01	25.16	-0.15	0.40	0.40	0.40	0.40	0.25	0.25	0.25
4	1	19.42	7.31	5.725	32.44	3.11	-0.11	-0.11	26.65	-0.03	0.10	0.10	0.10	0.10	-0.04	-0.04	-0.04
5	2	20.36 \pm 0.46	7.28 \pm 0.01	5.87 \pm 0.11	33.51 \pm 0.48	1.88 \pm 0.39	0.08 \pm 0.14	0.08 \pm 0.14	23.45 \pm 5.17	-0.25 \pm 0.01	-0.03 \pm 0.15	-0.03 \pm 0.15	-0.03 \pm 0.15	-0.03 \pm 0.15	0.14 \pm 0.05	0.14 \pm 0.05	0.14 \pm 0.05
6	2	20.78 \pm 0.93	7.58 \pm 0.00	6.18 \pm 0.35	34.54 \pm 0.58	5.79 \pm 5.29	0.21 \pm 0.10	0.21 \pm 0.10	38.85 \pm 24.05	0.23 \pm 0.33	-0.02 \pm 0.14	-0.02 \pm 0.14	-0.02 \pm 0.14	-0.02 \pm 0.14	0.30 \pm 0.39	0.30 \pm 0.39	0.30 \pm 0.39
7	3	20.07 \pm 0.51	7.00 \pm 0.11	5.72 \pm 0.27	32.78 \pm 0.59	2.36 \pm 0.62	0.13 \pm 0.04	0.13 \pm 0.04	53.01 \pm 1.20	-0.10 \pm 0.07	-0.09 \pm 0.18	-0.09 \pm 0.18	-0.09 \pm 0.18	-0.09 \pm 0.18	0.20 \pm 0.25	0.20 \pm 0.25	0.20 \pm 0.25
8	3	20.20 \pm 1.57	6.99 \pm 0.09	5.65 \pm 0.16	32.85 \pm 1.58	7.38 \pm 0.91	0.05 \pm 0.12	0.05 \pm 0.12	72.35 \pm 1.59	-0.02 \pm 0.03	-0.07 \pm 0.04	-0.07 \pm 0.04	-0.07 \pm 0.04	-0.07 \pm 0.04	0.21 \pm 0.20	0.21 \pm 0.20	0.21 \pm 0.20
9	3	20.83 \pm 1.75	6.92 \pm 0.07	5.48 \pm 0.16	33.23 \pm 1.76	2.89 \pm 0.31	0.03 \pm 0.22	0.03 \pm 0.22	65.09 \pm 3.40	-0.05 \pm 0.12	-0.01 \pm 0.09	-0.01 \pm 0.09	-0.01 \pm 0.09	-0.01 \pm 0.09	0.22 \pm 0.32	0.22 \pm 0.32	0.22 \pm 0.32
10	3	18.93 \pm 0.26	6.85 \pm 0.06	5.34 \pm 0.21	33.17 \pm 2.53	1.81 \pm 0.38	0.00 \pm 0.35	0.00 \pm 0.35	33.92 \pm 1.88	0.02 \pm 0.17	-0.17 \pm 0.09	-0.17 \pm 0.09	-0.17 \pm 0.09	-0.17 \pm 0.09	-0.13 \pm 0.42	-0.13 \pm 0.42	-0.13 \pm 0.42
11	2	20.68 \pm 0.51	7.04 \pm 0.05	5.92 \pm 0.11	33.64 \pm 0.52	2.21 \pm 1.50	-0.16 \pm 0.10	-0.16 \pm 0.10	58.01 \pm 5.13	0.00 \pm 0.24	0.06 \pm 0.07	0.06 \pm 0.07	0.06 \pm 0.07	0.06 \pm 0.07	0.01 \pm 0.30	0.01 \pm 0.30	0.01 \pm 0.30
12	3	19.65 \pm 0.49	6.14 \pm 0.09	5.35 \pm 0.07	31.14 \pm 0.50	2.00 \pm 0.37	0.18 \pm 0.39	0.18 \pm 0.39	48.45 \pm 1.26	0.03 \pm 0.13	-0.08 \pm 0.07	-0.08 \pm 0.07	-0.08 \pm 0.07	-0.08 \pm 0.07	0.45 \pm 0.11	0.45 \pm 0.11	0.45 \pm 0.11
13	3	19.26 \pm 0.72	6.06 \pm 0.03	4.89 \pm 0.12	30.21 \pm 0.73	2.51 \pm 0.06	0.00 \pm 0.36	0.00 \pm 0.36	52.19 \pm 1.70	0.03 \pm 0.07	-0.03 \pm 0.03	-0.03 \pm 0.03	-0.03 \pm 0.03	-0.03 \pm 0.03	0.12 \pm 0.29	0.12 \pm 0.29	0.12 \pm 0.29
Mean		19.96 \pm 0.80	7.02 \pm 0.47	5.90 \pm 0.73	33.03 \pm 1.42	3.62 \pm 2.07	-0.09 \pm 0.32	-0.09 \pm 0.32	44.03 \pm 15.59	0.14 \pm 0.55	-0.01 \pm 0.16	-0.01 \pm 0.16	-0.01 \pm 0.16	-0.01 \pm 0.16	0.06 \pm 0.33	0.06 \pm 0.33	0.06 \pm 0.33
Certified values		-	-	-	32.20 \pm 1.99	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure S8. Representative GC-ICP-MS chromatograms (A) Level 2; (B) Level 3 and (C) Level 4 of NIST SRM 955c. Level 2 was spiked with 1 ng of each labelled species. Level 3 was spiked with 2 ng of ^{201}Hg -enriched MeHg and ^{198}Hg -enriched EtHg and 5 ng of $^{199}\text{Hg}(\text{II})$. Level 4 was spiked with 3 ng of ^{201}Hg -enriched MeHg and ^{198}Hg -enriched EtHg and 10 ng of $^{199}\text{Hg}(\text{II})$.

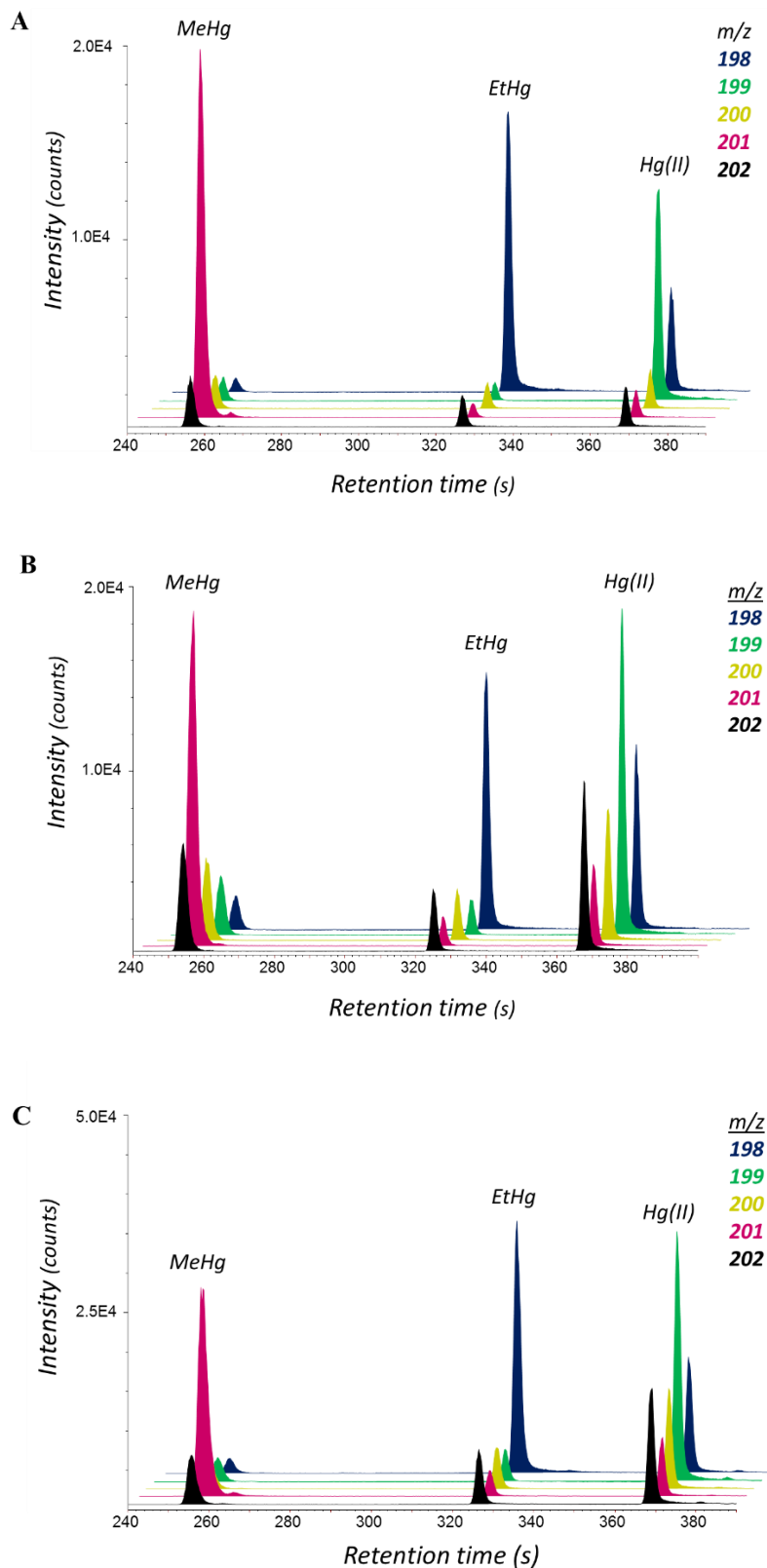


Table S8. Average concentration values ($\mu\text{g Hg g}^{-1}$) of MeHg, Hg(II) and interconversion factors obtained for 4 and 8 independent replicates of Certified Materials IAEA-085 and IAEA-086 (Human hair) respectively. Uncertainties are expressed as 1s standard deviation of the injections performed in each case.

Replicate	Number of injections	Hg(II)	MeHg	EtHg	THg	% MeHg→Hg(II)	Hg(II)→MeHg	% EtHg→Hg(II)	Hg(II)→EtHg	% MeHg→EtHg	% EtHg→MeHg
IAEA 085 (Human hair with spiked MeHg)											
1	3	0.65 ± 0.04	22.89 ± 0.34	0.01 ± 0.00	23.55 ± 0.34	1.43 ± 0.11	4.55 ± 5.05	11.68 ± 0.91	-0.67 ± 0.05	0.00 ± 0.00	2.02 ± 4.45
2	3	0.67 ± 0.03	23.06 ± 0.32	0.01 ± 0.00	23.74 ± 0.32	3.40 ± 0.14	-0.69 ± 3.94	21.83 ± 0.89	-0.57 ± 0.04	0.00 ± 0.00	-0.43 ± 4.01
3	3	0.68 ± 0.05	22.99 ± 0.26	0.01 ± 0.00	23.68 ± 0.27	3.88 ± 0.12	-4.73 ± 1.95	22.62 ± 0.32	-0.61 ± 0.06	0.00 ± 0.00	-5.93 ± 2.34
4	1	0.70	23.52	0.01	24.23	0.80	27.81	6.88	-0.85	0.00	8.57
Mean		0.67 ± 0.02	23.2 ± 0.3	0.01 ± 0.00	24.0 ± 0.3	2.18 ± 1.35	0.73 ± 3.58	14.87 ± 6.80	-0.63 ± 0.04	0.00 ± 0.00	0.91 ± 4.32
Certified values		-	22.9 ± 1.0	-	23.2 ± 0.8						
IAEA 086 (Human hair)											
1	3	0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.03	1.56 ± 0.30	-0.14 ± 0.35	12.12 ± 0.82	-0.62 ± 0.02	-0.07 ± 0.03	-0.03 ± 0.07
2	3	0.26 ± 0.01	0.28 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.54 ± 0.01	1.52 ± 0.13	0.13 ± 0.20	13.81 ± 0.55	-0.57 ± 0.04	-0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.21
3	3	0.30 ± 0.01	0.27 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.00	1.48 ± 0.06	-0.16 ± 0.07	15.63 ± 0.25	-0.60 ± 0.01	-0.04 ± 0.03	-0.03 ± 0.08
4	3	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.56 ± 0.01	2.52 ± 0.09	-0.17 ± 0.19	31.91 ± 14.63	-5.90 ± 1.26	-0.39 ± 0.11	0.75 ± 0.14
5	3	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.01	2.22 ± 0.10	-0.09 ± 0.15	28.84 ± 4.31	-6.31 ± 0.58	-0.39 ± 0.06	2.24 ± 2.71
6	3	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.54 ± 0.01	2.35 ± 0.23	-0.22 ± 0.39	24.30 ± 6.99	-7.03 ± 0.52	-0.45 ± 0.03	-1.13 ± 1.71
7	3	0.28 ± 0.00	0.29 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.57 ± 0.01	3.06 ± 0.25	-0.27 ± 0.07	26.24 ± 2.88	0.10 ± 0.01	0.01 ± 0.01	-0.52 ± 3.68
8	3	0.26 ± 0.01	0.28 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.55 ± 0.01	2.87 ± 0.30	-0.18 ± 0.26	28.10 ± 14.53	0.09 ± 0.04	0.02 ± 0.01	11.10 ± 18.93
Mean		0.278 ± 0.013	0.277 ± 0.006	0.004 ± 0.001	0.558 ± 0.014	2.2 ± 0.62	-0.14 ± 0.12	22.62 ± 7.63	-2.61 ± 3.18	-0.17 ± 0.20	1.56 ± 3.98
Certified values		-	0.258 ± 0.022	-	0.573 ± 0.039						

Figure S9. Representative GC-ICP-MS chromatograms of Certified Reference Materials IAEA-085 (a) and IAEA-086 (b).

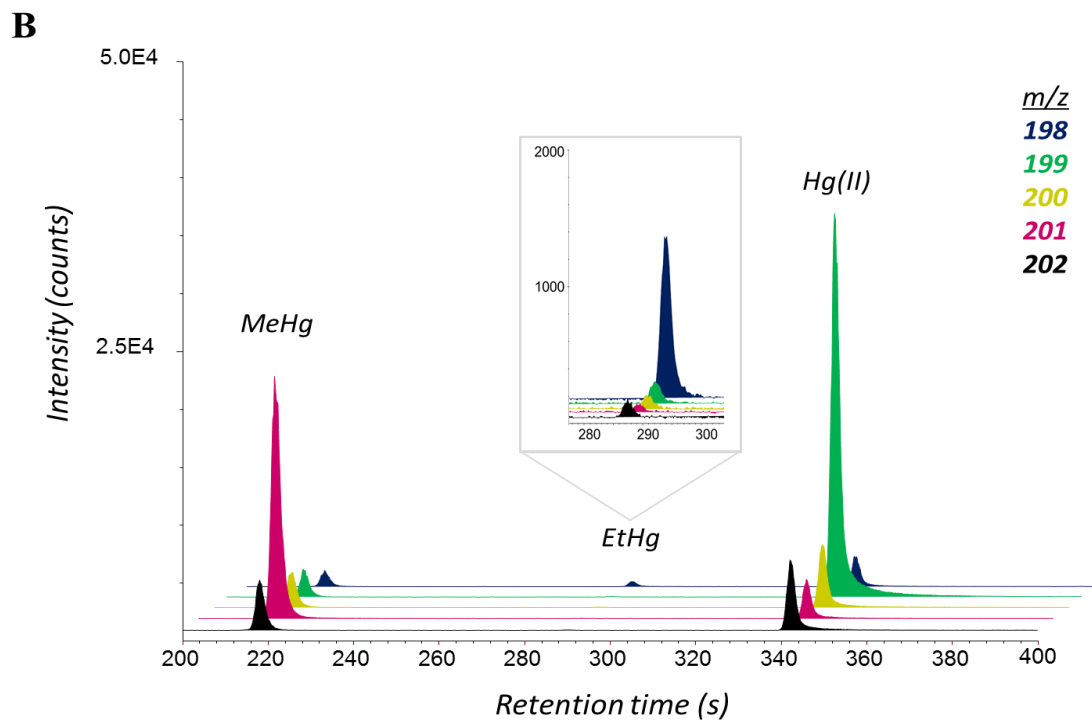
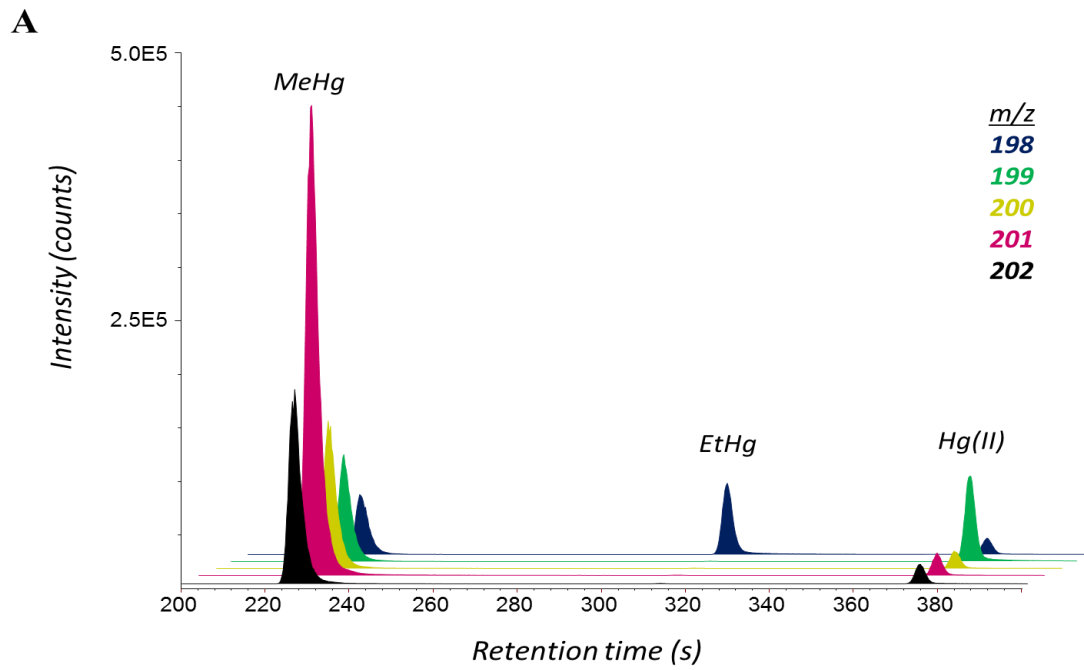


Table S9. Theoretical concentrations, experimental concentrations and associated recoveries obtained in the analysis of fortified real samples of urine at 1, 2, 5 ng g⁻¹ for each Hg species. The corresponding background level found in urine was subtracted from the experimental concentration to calculate the recovery values.

	Concentration Level	Theoretical concentration	Experimental concentration	Recoveries %	Mean
Hg(II)	1 ng g ⁻¹	0.92	1.89	94.3	97.4 ± 6.0
		0.96	1.92	93.7	
		0.95	2.01	104.4	
	2 ng g ⁻¹	1.82	2.86	100.9	97.3 ± 4.7
		1.93	2.80	92.0	
		1.84	2.85	99.1	
	5 ng g ⁻¹	4.86	5.93	100.9	98.1 ± 3.4
		4.80	5.78	99.1	
		4.94	5.69	94.3	
	Background concentration of Hg(II) in urine				1.03 ± 0.04
MeHg	1 ng g ⁻¹	0.80	0.82	96.2	98.3 ± 1.9
		0.81	0.85	98.9	
		0.89	0.93	99.8	
	2 ng g ⁻¹	1.95	1.96	98.4	96.9 ± 1.5
		1.99	1.97	96.8	
		1.93	1.89	95.4	
	5 ng g ⁻¹	4.94	4.86	97.4	96.0 ± 1.5
		4.89	4.75	96.2	
		5.08	4.85	94.5	
	Background concentration of MeHg in urine				0.05 ± 0.00
EtHg	1 ng g ⁻¹	0.97	0.84	85.1	93.8 ± 8.0
		0.93	0.90	95.6	
		1.00	1.02	100.7	
	2 ng g ⁻¹	1.94	1.90	97.4	99.1 ± 5.0
		2.02	1.93	95.2	
		1.95	2.05	104.7	
	5 ng g ⁻¹	4.91	4.81	97.7	98.1 ± 2.8
		4.86	4.65	95.4	
		4.97	5.03	101.0	
	Background concentration of EtHg in urine				<DL

Figure S10. Representative GC-ICP-MS chromatograms of a urine sample fortified at A) 1 B) 2 and C) 5 ng g⁻¹ for the three mercury species and spiked with 0.5, 1 and 2 ng of ²⁰¹MeHg, ¹⁹⁸EtHg and ¹⁹⁹Hg(II) respectively.

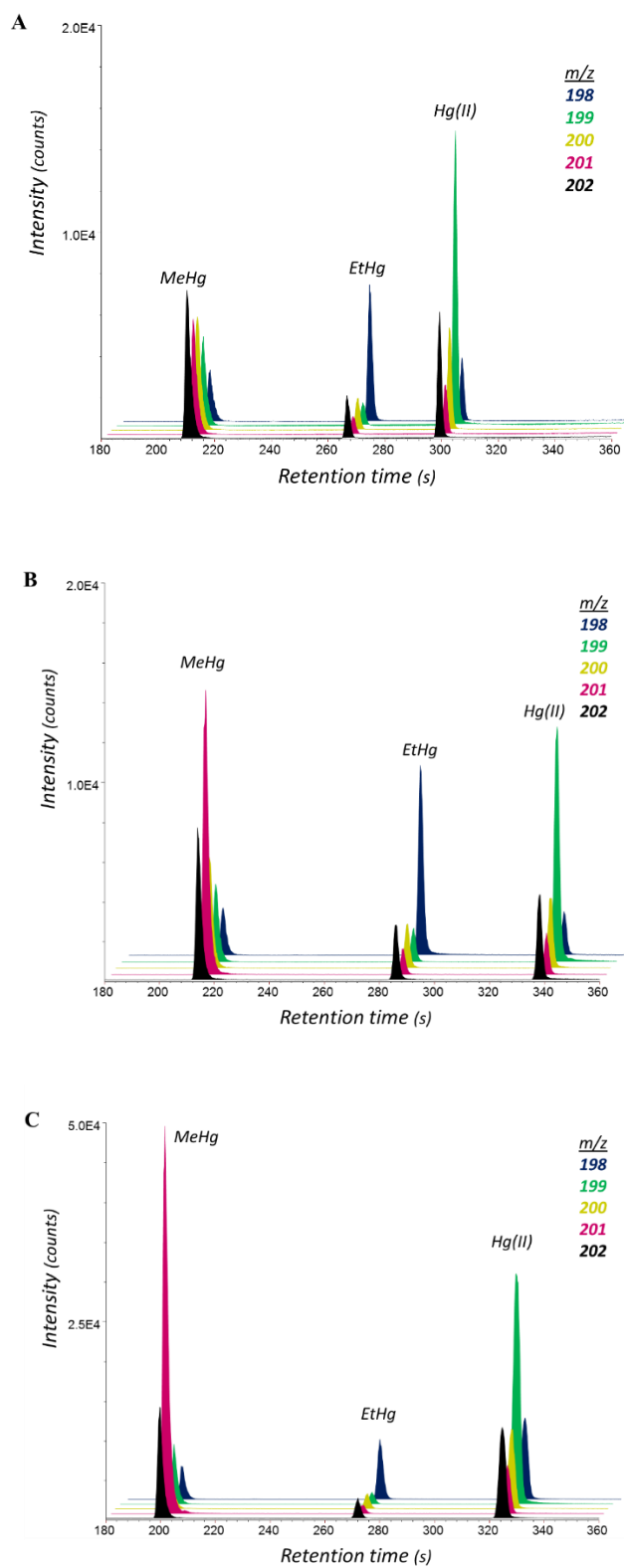


Figure S11. GC-ICP-MS chromatograms obtained in the analysis of a human blood sample applying focused microwaves during (a) 4.5 min; (b) 6 min; (c) 8 min; (d) 10 min.

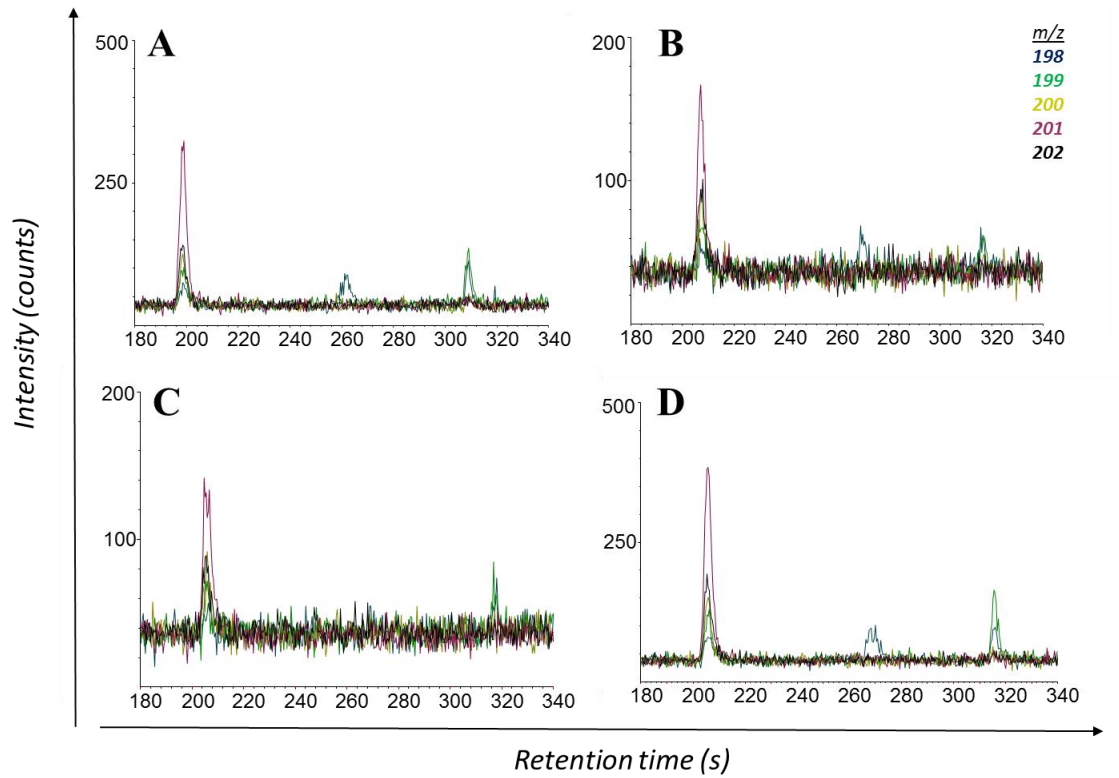
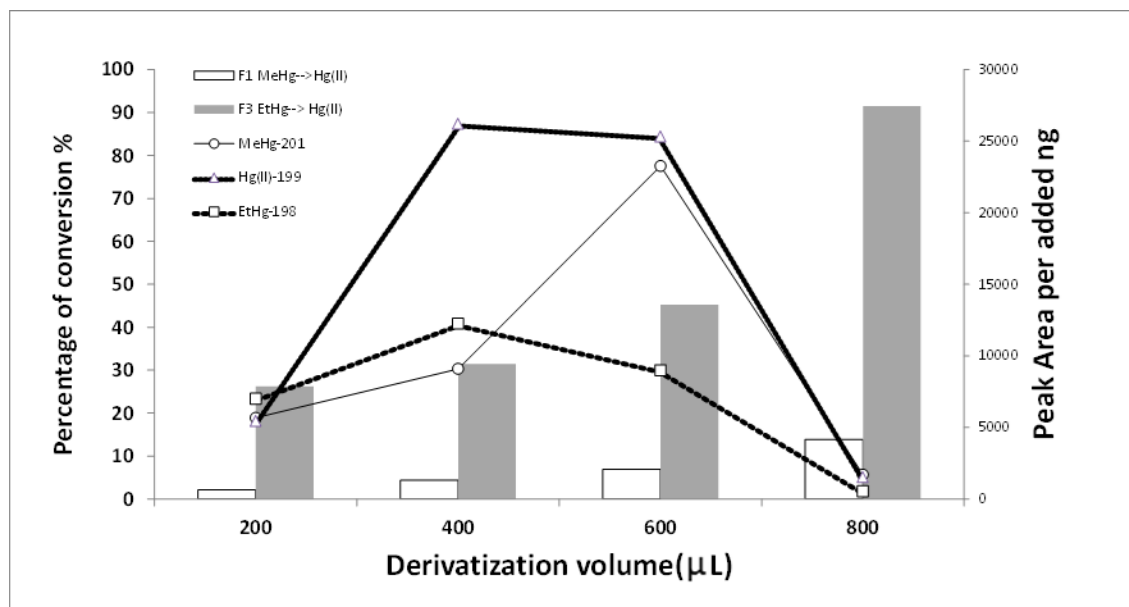


Figure S12. Percentages of conversion of MeHg and EtHg into Hg(II) and peak area per added ng of $^{201}\text{MeHg}$, $^{199}\text{Hg(II)}$ and $^{198}\text{EtHg}$ obtained when adding different volumes of NaBPr_4 in the analysis of 0.150 g of the same human blood sample and derivatizing with 4 mL of extract.



D.1.4. Artículo Científico II

Certification of Mercury and Tin Species in Fresh Frozen SRM 1974c (MYTILUS EDULIS)

Silvia Queipo Abad², Pablo Rodríguez González^{2*}, José Ignacio García Alonso², W. Clay Davis^{1*}

¹ *Chemical Sciences Division, National Institute of Standards and Technology, Charleston, South Carolina 29412, United States*

² *Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006 – Oviedo (Spain)*

* Authors for correspondence: clay.davis@nist.gov, rodriguezpablo@uniovi.es

ABSTRACT

The Standard Reference Material (SRM) 1974c is a fresh frozen mussel tissue homogenate intended for use in evaluating analytical methods for the determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyl congeners, chlorinated pesticides, and polybrominated diphenyl ether congeners in marine bivalve mollusk tissue and similar matrices. SRM 1974c has been developed to replace its predecessor SRM 1974b, for which the supply is depleted. However, the certification of mass fraction values of other important organometallic contaminants in SRM 1974c such as methylmercury or tributyltin is still missing. This work presents the results of the certification of total mercury, inorganic mercury, methylmercury, mono-, di-, and tributyltin content. The determination of total mercury content was carried out by cold vapor isotope dilution inductively coupled mass spectrometry (CV-ID-ICPMS). The determination of species-specific mass fraction values was carried out by two independent laboratories (NIST and University of Oviedo) by isotope dilution and gas chromatography coupled to ICP-MS. Single spiking species-specific isotope dilution mass spectrometry was applied for the certification of mass fraction values of butyltin compounds whereas double spiking isotope dilution mass spectrometry was applied for the certification of mass fraction values of methyl mercury and inorganic mercury to correct for any analyte interconversions throughout the sample preparation procedure. The speciation procedures involved alkaline digestion of the sample by focused microwaves or solid-liquid extraction at 37 °C followed by derivatization with NaBEt₄ and back-extraction into iso-octane. The addition of total mercury as well as mercury and tin species values will establish metrological traceability for environmental contaminant measurements in similar matrix samples.

KEYWORDS

ICP-MS, speciation, mercury, tin, methylmercury, monobutyltin, dibutyltin, tributyltin, reference material.

1. INTRODUCTION

Methylmercury (MeHg) is a highly neurotoxic compound formed from the biotic methylation of Hg(II) (inorganic mercury) at the water-sediment interface in aquatic ecosystems. It can be biomagnified through the food chain causing adverse effects in humans and wildlife via fish consumption [1]. Butyltin compounds, mono-, di- and tributyltin (MBT, DBT and TBT, respectively) have been widely used as plastic stabilizers, biocides or wood preservatives in industrial or agricultural applications. In marine ecosystems the presence of TBT is due to its use as an additive in paints applied to ship hulls to avoid biological fouling, whereas MBT and DBT occurrence in the marine environment is mainly due to TBT photochemical degradation [2]. The endocrine system of aquatic organisms can be disrupted even at TBT concentrations lower than 1 ng L^{-1} .

The quality control and the evaluation of analytical methods for the determination of these organometallic contaminants in biological and environmental matrices is seriously limited by the poor availability of certified reference materials [3]. An appropriate reference material must present a similar matrix composition and analyte mass fraction than real samples. Also, analyte mass fraction in certified reference materials must be homogeneous, long-term stable and of course, they must be accurately and precisely certified [4]. The majority of tissue matrix SRMs available from national metrology institutes (NIMs) have been issued in the form of homogeneous freeze-dried powders that provide excellent long-term stability when properly stored and handled. However, the physical and chemical characteristics of these materials are generally different from real world sample matrices, actually analyzed in analytical, environmental, toxicological, and biological laboratories which make them less commutable to natural "wet" samples. Fresh-frozen "wet" tissues are more representative of samples that are traditionally analyzed in the laboratories and appear to be particularly suitable for the characterization of organic and inorganic compounds that are subjected to degradation in nature and whose stability can be maintained at low temperatures. [5]

SRM 1974 was produced in 1989 by NIST and was the first natural-matrix reference material that met tissue matrix requirements of both organic and inorganic analysts [6]. This material was a fresh-frozen tissue homogenate from the mussel population collected in the Dorchester Bay (Boston Harbor, USA) and was only subjected to cryogenic grinding for sample preparation. It was issued with certified concentration values for 9 polycyclic aromatic hydrocarbons. After SRM 1974 supply was depleted, a new SRM 1974a was prepared in 1995 collecting mussels from the same area in Boston Harbor. SRM 1974a was issued with an expanded range of organic constituents including 15 PAHs; 20 PCB congeners and 7 pesticides.

In 1997 the Certificate of Analysis for SRM 1974a was revised to include the methylmercury content [7]. After the supply of SRM 1974a was depleted mussels were collected at the same Boston Harbor site in 1999 for the development of the renewal material SRM 1974b. In 2003, this material was certified in 22 PAHs; 31 PCB congeners 7 pesticides and total mercury (THg). Four years later the methylmercury content in this material was certified applying two independent methods based on isotope dilution mass spectrometry (IDMS) [5]. Currently, the supply of SRM 1974b has been depleted so a new SRM 1974c prepared from mussels (*Mytilus edulis*) collected in Dorchester Bay (MA, USA), is available. SRM 1974c is certified in mass fraction values for 22 PAHs, 38 PCB congeners, 11 chlorinated pesticides, and 5 PBDE congeners. However, reference values for important organometallic contaminants such as MeHg or TBT were missing.

This work presents the certification of the mass fraction values of MeHg, Hg(II), THg, TBT, DBT and MBT in the currently available fresh frozen standard reference material NIST 1974c. The determination of total mercury content was carried out at NIST by cold vapor isotope dilution inductively coupled mass spectrometry (CV-ID-ICPMS) whereas the determination of species-specific mass fraction values was carried out by two independent laboratories (NIST and University of Oviedo). For this purpose, species-specific isotope dilution and Gas chromatography coupled to ICP-MS was applied in both laboratories. In the case of Hg speciation analysis, double spiking species-specific IDMS was applied to correct for methylation and demethylation reactions occurring during the sample preparation procedure [8]. For the determination of butyltin compounds, single spiking IDMS was applied as the risk of debutylation reactions was minimized applying previously validated extraction conditions that do not promote species degradation [9]. The utility of natural-matrix fresh-frozen SRMs of marine origin are similar to those often encountered in the analysis of fresh water and marine samples and can be used to validate the complete analytical procedure including extraction, isolation, and quantification of the analytes. Measurement traceability and comparability is an important component for the realization of measurement confidence in environmental monitoring and the development of environmental policy / regulation. The use of SRMs in analytical workflows allows for an explicit link of traceability of any measurement made by any instrument to a desired uncertainty level. Environmental monitoring and food quality assessment of mercury and tin species in seafood and other foodstuffs make it imperative to have reference materials to assess laboratory measurements and link measurement traceability. SRM 1974c adds to the list of SRMs that contain certified values for organometallic species available for such purposes.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Collection and preparation of SRM material

The mussels (*Mytilus edulis*) used for the preparation of SRM 1974c were collected in Dorchester Bay (MA, USA) in 2004. The mussels were frozen and delivered to NIST (Hollings Marine Laboratory, Charleston, SC) where they were stored in a liquid nitrogen (LN₂) vapor-phase freezer at -150 °C. For processing, the mussels were allowed to warm to approximately 0 °C, shells were opened, and the tissue removed using titanium knives. Approximately 70 kg of mussel tissue was stored in Teflon bags in an LN₂ vapor-phase freezer (-150 °C) until homogenization. For homogenization, the frozen mussel material was removed from the Teflon bags, placed in a pre-frozen Teflon smasher, and crushed into smaller pieces using a smashing device. The frozen, crushed mussel material was then immediately placed back in an LN₂ vapor-phase freezer (-150 °C) and divided among four stainless steel buckets within the freezer. The Palla VM-KT Vibrating Cryomill (KHD Humboldt Wedag GmbH, Cologne, Germany) was cooled allowing LN₂ to flow through the mill until a temperature of -180 °C was reached. The LN₂ was shut off and the crushed mussel tissue from all 4 buckets was processed through the cryomill until a fresh, frozen powder was created. This procedure was repeated four times prior to bottling to ensure the mussel material was completely blended. Subsamples (approximately 10 g) of the frozen mussel powder homogenate were aliquoted into cleaned, pre-cooled glass jars within an LN₂ vapor-phase freezer (-150 °C) and the glass jars were then stored at -80 °C.

2.2. Instrumentation

2.2.1. Instrumentation employed at NIST

The separation and quantification of the mercury and tin species at NIST was performed with a Thermo Trace GC Ultra equipped with a 30 m DB-5MS+DG 250 µm i.d. (J & W Scientific, Folsom, CA, USA) capillary column coated with a 0.25 µm thick film of (5 %-phenyl)-methylpolysiloxane. The GC was coupled to a Thermo Elemental X7 quadrupole ICP-MS using a Thermo GC/ICP-MS commercial interface. The transfer column consisted of a 1 m MTX-5 280 µm i.d. stainless steel capillary (Restek, Bellefonte, PA) coated with a 0.1 µm thick film of (5 %-phenyl)-methylpolysiloxane. Extraction of the mercury and tin species was performed in a CEM Explorer focused microwave oven (Matthews, NC, USA). The centrifugation of the derivatized samples was performed using a Thermo ICE Centra 3 centrifuge (Needham Heights, MA, USA) and solid phase extraction (SPE) sample clean-up was performed using a SPE Rapidtrace workstation (Caliper Life Science, Hopkinton, MA).

2.2.2. Instrumentation employed at University of Oviedo

The separation and quantification of the analytes at the University of Oviedo, was performed with a gas chromatograph model Agilent 6890N (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) fitted with a split/splitless injector and a HP-5MS capillary column (cross-linked 5 % phenyl methyl siloxane, 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm coating). The gas chromatograph was coupled to an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer model Agilent 7500ce using a laboratory-made transfer line. All spiking and dilution steps were performed by weight on an analytical balance Metler Toledo MS Semi-micro MS205DU (0.0001 g). Extraction of the mercury compounds was performed in a focused microwave Explorer Hybrid from CEM Corporation. The extraction of the butyltin compounds was performed in a water bath at 37 °C using a hot plate RTC Basic (IKA, Staufen, Germany) equipped with a temperature probe. The centrifugation of the derivatized samples was performed using a centrifuge model CENTRO-8 BL (JP Selecta, Barcelona, Spain).

2.3. Determination of mercury and butyltin compounds at the NIST

For the sample analysis, 6 randomly selected jars of SRM 1974c from across the production batch were analyzed utilizing single aliquots of ≈ 1 g. The individual aliquots from each jar of SRM 1974c, along with three aliquots of SRM 1974b and three aliquots of SRM 1974a were accurately weighed into clean 10 mL borosilicate glass microwave vessels and spiked with a known mass of IRMM-670 ²⁰²Hg enriched methylmercury CRM solution and inorganic ¹⁹⁸Hg solution prepared in high-purity water immediately prior to spiking. Approximately 3 mL of 25 % mass fraction tetramethylammonium hydroxide (TMAH, Fluka, Switzerland) in water was added to each sample vessel. The vessels were sealed, and the contents extracted in an Explorer focused microwave oven at 35 W for 4.5 min. The resulting extracts were allowed to cool to room temperature and buffered with 0.550 mL of 1 mol L⁻¹ sodium acetate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 0.650 mL of UHP nitric acid (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) to set the pH at 5. Approximately 100 µL of 20 % mass fraction sodium (tetra-n-ethyl)borate (Sigma-Aldrich) was added to the microwave extracts, and the samples were shaken for 5 min to ensure complete derivatization of the mercury species. Two mL of hexane were added to the derivatized solutions, and the samples were again vortexed to ensure complete extraction of the derivatized species into the organic layer. The tubes were centrifuged for 3 min at 157 rad s⁻¹ to facilitate separation of the organic and aqueous phases, and the organic phase was then transferred to pre-cleaned autosampler vials. The samples then underwent a clean-up procedure involving solid phase extraction (SPE) on 3 mL cartridges packed with 5 % (mass fraction) water-deactivated alumina. Before use, the alumina was baked overnight at 650 °C and deactivated prior to use, after cooling to room temperature in a desiccator. Using a SPE Rapidtrace workstation (Caliper Life Science, Hopkinton, MA), the SPE cartridges were first conditioned with 6 mL 1:1 (volume fraction) dichloromethane–hexane followed by 8 mL hexane, both at 1.2 mL min⁻¹. The sample was loaded on to the SPE column at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The derivatized mercury species were collected

in a 10 mL acid-cleaned glass culture tube by elution with 4 mL hexane delivered at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Collected fractions were concentrated to ≈ 0.2 mL under a nitrogen stream with a Turbovap (Caliper Life Science) and analyzed by GC/ICP-MS. Quantification was achieved by speciated isotope dilution. The standard calibration mixtures and blanks followed the above procedure with the exception that they were not exposed to the microwave extraction in order to avoid significant decomposition of the organomercury spikes. Mass bias correction was determined by measuring a derivatized solution of SRM 3133 Mercury (Hg) Standard Solution (NIST, Gaithersburg, MD, USA).

WARNING: Methylmercury and derivatized forms of organomercury compounds are highly toxic and must be handled with appropriate personal protection.

2.4. Determination of mercury compounds at the University of Oviedo

The sample (fresh-frozen mussel tissue) was stored at -80 °C until analysis. For the determination of Hg(II) and MeHg, an amount of 0.15 g of the frozen tissue was directly weighed in a 10 mL microwave glass vessel, containing a magnetic stirring bar. Immediately, the sample was spiked with 0.15 g of a 10 ng g⁻¹ solution of ²⁰¹Hg-enriched MeHg and 0.15 g of a 10 ng g⁻¹ solution of ¹⁹⁹Hg-enriched Hg(II). All the enriched solutions were purchased from ISC Science (Oviedo, Spain). Dilutions of ¹⁹⁹Hg(II) were performed with 2 % sub-boiled HCl in Milli-Q water. Diluted working solutions for ²⁰¹MeHg were prepared using a 3:1 mixture of acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) and methanol (Sigma-Aldrich) and were kept in the dark at -18 °C until analysis. PTFE-coated magnetic stirring bars and the glass vessels employed for the microwave extractions were purchased from CEM Corporation. The extraction of mercury compounds was performed with 25% TMAH (Sigma-Aldrich). Then a volume of 4 mL of 25% TMAH was added to the vessel with the sample, and the vial was closed and placed in the microwave. The microwave assisted digestion of the sample was performed at 70 °C for 4 minutes. After digestion of the sample 1 mL of the digest was transferred to a 7 mL clear glass vial containing 4 mL of acetic acid/sodium acetate buffer (Sigma-Aldrich) pH 4 in Milli-Q water. Then, the pH was re-adjusted to the corresponding pH using concentrated sub-boiled HCl. For derivatization and liquid-liquid extraction of mercury compounds, 0.3 mL of a 2 % mass density sodium (tetra-n-propyl)borate (LGC Standards, Wesel, Germany) in Milli-Q water and 1 mL of hexane (Sigma-Aldrich) were added to the extract. After that, the samples were centrifuged (524 rad s⁻¹ for 5 min), and the organic phases were cleaned-up using homemade Florisil (Sigma-Aldrich) columns. Finally, most of the organic layer was transferred to a 2 mL clear glass vial and stored at -18 °C until analysis. The same procedure was applied when analyzing the CRM DOLT-4 (purchased to the National Research Council of Canada, Montreal) to evaluate the extraction conditions applied to SRM 1974c, the only difference being the dilution factor of the spike solutions. The CRM DOLT-4 was spiked with 0.15 g of a 1 µg g⁻¹ solution of ²⁰¹Hg-enriched MeHg and 0.15 g of a 1 µg g⁻¹ solution of ¹⁹⁹Hg-enriched Hg(II).

2.5. Determination of butyltin compounds at NIST

The determination of butyltins followed the same sample preparation procedure as the mercury speciation analysis with the exception of the isotopic spike. The enriched mono-, di-, and tributyltin spike solution was purchased from ISC Science (Oviedo, Spain). Diluted working solutions for the ^{119}Sn -enriched butyltin mixture were prepared using high purity water immediately prior to use. Mass bias correction was determined by measuring a derivatized solution of SRM 3161a Tin (Sn) Standard Solution (NIST).

2.6. Determination of butyltin compounds at the University of Oviedo

The sample (fresh-frozen mussel tissue) was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. For the determination of butyltin compounds, an amount of 0.15 g of the frozen tissue was directly weighed in a 15 mL amber glass vial (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Immediately, the sample was spiked with 0.15 g of a 1:50 dilution of a ^{119}Sn -enriched mixture of butyltin compounds of an approximate concentration of 20, 14 and 2 ng (of Sn) g^{-1} for TBT, DBT and MBT, respectively. The enriched solution was purchased from ISC Science (Oviedo, Spain). Diluted working solutions for ^{119}Sn -enriched butyltin mixture were prepared using a 3:1 mixture of acetic acid (Merck, Darmstadt, Germany) and methanol (Sigma-Aldrich) and were kept in the dark at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. The extraction of butyltin compounds was accomplished by the addition of 4 mL of acetic acid-methanol (3:1) mixture in a water bath at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 hours applying a manual shaking of the vials every 30 minutes. It was previously demonstrated that such extraction procedure provided a complete extraction of butyltin compounds in mussel tissue without degradation [10]. The derivatization of butyltin compounds were performed with 0.5 mL of 2 % mass density sodium (tetra-n-ethyl)borate (LGC Standards, Wesel, Germany) in Milli-Q water followed by 1 mL of hexane for liquid-liquid extraction. The derivatization and extraction into hexane were accomplished by five minutes of manual shaking. After that, the samples were centrifuged (524 rad s^{-1} for 5 min), and the organic phases were cleaned-up using homemade Florisil (Sigma-Aldrich) columns. Finally, most of the organic layer was transferred to a 2 mL clear glass vial and stored at $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

2.7. Measurement of isotope ratios by GC-ICP-MS at NIST

The chromatograms of the mercury and tin species were recorded in transient TRA mode monitoring isotopes at m/z 119, 120, 198, 200 and 202 at dwell times of 50 ms each. For the speciated isotope dilution measurements, ratios from the integrated peak areas of each species were downloaded as CSV files to a Microsoft Excel spreadsheet for calculations of the individual species mass fraction value. All data were corrected for detector dead-time and instrument mass

bias determined from comparison of the isotope ratios of chromatographic peak areas from 50 ng g⁻¹ standard solutions of SRMs 3133 and 3161a, with the natural isotope ratios from IUPAC.

2.8. Measurement of isotope ratios by GC-ICP-MS at the University of Oviedo

Just before the GC-ICP/MS injection of the samples an additional step of pre-concentration step was carried out in a dedicated unit (Minivap, Supelco, Bellefonte PA, USA). The sample was pre-concentrated under a gentle stream of nitrogen until approximately 10-20 µL. All samples were injected in triplicate into the GC-ICP/MS system. The integration of the chromatographic peaks was carried out using the commercial GC-MS Agilent software supplied with the ICP-MS instrument. Isotope ratios were always computed as peak area ratios. The measurement parameters are given in Table 1. Mass bias corrected isotope ratios were employed to calculate the isotope abundances of each mercury and butyltin compounds in the samples. More details on this calculation procedure can be found elsewhere [11]. Briefly, the concentration of the species was carried out by isotope pattern deconvolution. This procedure assumes that the isotopic composition in a mixture of natural abundance and labeled compound is a linear combination of the isotope pattern of both constituents of the mixture. Thus, applying multiple linear regression, the molar fraction of the natural abundance compound and the isotopically enriched compound, can be calculated from the experimental mass spectra.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Quality control measurements for the determination of Hg(II) and MeHg

Before starting with the analysis of the SRM 1974c, the collaborating laboratory (University of Oviedo) evaluated the focused microwave extraction conditions with the analysis of the Certified Reference Material DOLT-4 (Dogfish liver). Four independent sample extractions were performed, and the selection of the extraction conditions were based on previous results [9]. Two independent replicates were extracted at 70 °C during 4 minutes and another two replicates at 70 °C during 8 minutes. Each extracted sample was injected in the GC-ICP-MS system in triplicate in order to obtain an estimation of the instrumental uncertainty. The mass fraction obtained in each digestion including the uncertainties calculated as 1s standard deviation from n=3 independent injections are listed in Table 2 for MeHg, Hg(II) and total Hg (THg) as well as methylation and demethylation percentages. As can be observed in Table 2, no significant differences between the values obtained under both microwave programs were obtained and the MeHg and total Hg mass fraction were well in agreement with the certified values. Thus, due to the shorter analysis time, 70 °C and 4 minutes were selected to carry out the extraction of the SRM 1974c material. NIST also performed quality control measurements analyzing the reference

materials SRM 1974a and SRM 1974b (fresh frozen mussel tissues). As can be observed in Table 3, the quality control measurements of the three sample preparations and analysis of both materials were in agreement with the certified values.

3.2. Results obtained for the determination of Hg(II), MeHg and total Hg in SRM 1974c

Two independent sample extractions on each of the four jars available of NIST SRM 1974c, were carried out for mercury speciation analysis at the University of Oviedo. Therefore, $n=8$ independent replicates were injected for each compound in triplicate into the GC-ICP-MS. A summary of the mass fraction obtained is given in Table 4. The concentrations of the compounds are reported as wet-mass fraction. The University of Oviedo reported mass fraction on wet mass of $8.25 \pm 0.17 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$ and $9.43 \pm 1.59 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$ for MeHg and Hg(II) respectively (uncertainties are expressed as the standard deviation from the eight independent replicates). These results were obtained by double spike species-specific IDMS which have the capability of correcting for species interconversion during sample preparation. Methylation factors obtained in the analyzed replicates ranged from 0.44 to 1.16 %. The demethylation factors obtained ranged from 1.27 to 3.99 %. The uncertainties of the interconversion factors were about 0.5%, expressed as the standard deviation from $n=3$ injections in the GC-ICP-MS system. The Oviedo results were combined with the single sample extractions and quantification of mercury species from the six randomly selected jars across the sample production of SRM 1974c. NIST reported mass fraction values on wet mass of $10.93 \pm 0.84 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$ and $7.74 \pm 0.40 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$ for MeHg and Hg(II), respectively (uncertainty are expressed as expanded uncertainties, U). The individual measurements resulted in certified values of $8.21 \pm 1.4 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$ and $9.94 \pm 3.0 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$ for MeHg and Hg(II), respectively, listed in Table 4. Additionally, the determination of total mercury content was carried out at NIST by cold vapor isotope dilution inductively coupled mass spectrometry (CV-ID-ICPMS). The certified value of $19.70 \pm 0.62 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$ is in agreement with the THg value obtained from the sum of individual Hg species measurements not only by NIST ($18.4 \pm 0.9 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$) but also by the University of Oviedo ($17.68 \pm 1.46 \mu\text{g Hg kg}^{-1}$).

3.3. Results obtained for the determination of TBT, DBT and MBT in SRM1974c

The collaborating laboratory (University of Oviedo) performed two independent sample extractions on each of the four jars available of NIST SRM 1974c for the determination of TBT, DBT and MBT in SRM1974c. The analyses were performed by single spiking species-specific IDMS using a mixture of the three compounds labelled in isotope ^{119}Sn . Although interconversions during sample preparation could not be corrected, the University of Oviedo applied experimental conditions that do not promote species interconversion [10]. Table 4 shows the concentration on wet mass of MBT, DBT and TBT present in the fresh frozen mussel tissue homogenate obtained

at the University of Oviedo. The mass fraction given for MBT, DBT and TBT were $0.97 \pm 0.15 \text{ ng g}^{-1}$, $2.88 \pm 0.41 \text{ ng g}^{-1}$ and $5.10 \pm 0.10 \text{ ng g}^{-1}$ respectively. The uncertainties are expressed as the standard deviation from the average of the eight independent replicates.

The tin speciation results from Oviedo were combined with the single sample extractions and quantification of the tin species from the six randomly selected jars across the sample production of SRM 1974c. NIST reported mass fraction on wet mass of $1.17 \pm 0.12 \text{ } \mu\text{g Sn kg}^{-1}$, $3.16 \pm 0.37 \text{ } \mu\text{g Sn kg}^{-1}$, $5.21 \pm 0.28 \text{ } \mu\text{g Sn kg}^{-1}$ for MBT, DBT and TBT, respectively as expanded uncertainties, U, at the approximately 95 % level of confidence $k=2$. The resulting certified values of $1.06 \pm 0.28 \text{ } \mu\text{g Sn kg}^{-1}$, $2.97 \pm 0.67 \text{ } \mu\text{g Sn kg}^{-1}$, $5.14 \pm 0.68 \text{ } \mu\text{g Sn kg}^{-1}$ for MBT, DBT and TBT, respectively are also listed in Table 4. The analyses were performed at NIST by single spiking species-specific IDMS using a mixture of the three compounds labelled in isotope ^{119}Sn . Table 3 shows that quality control measurements of the butyltin species in SRM 1974b were in good agreement with the reference values.

4. CONCLUSIONS

Individual results from the University of Oviedo and NIST were combined to obtain certified values for THg, MeHg, Hg(II), MBT, DBT and TBT in the SRM 1974c. The certified wet mass fractions were calculated as $\mu\text{g Hg}$ or Sn kg^{-1} . The certified value for THg was reported on a wet mass basis results from measurements obtained at NIST by CV-ID-ICP-MS. The expanded uncertainty (U), was calculated as $U = kuc$, in a manner consistent with the ISO/JGCM Guide [12]. The quantity uc represents, at the level of one standard deviation, the estimated uncertainty in the mass fraction for the mean of all bottles of SRM 1974c, because the underlying mass fraction is assumed to be the same for each bottle. The quantity, k , is the coverage factor used to obtain an expanded uncertainty that provides a symmetric approximately 95 % coverage interval. Certified values are values for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or taken into account. Matrix effects play a very important role in the analytical process and result and the addition of total mercury as well as mercury and tin species values will establish metrological traceability for environmental contaminant measurements in similar samples. Metrological traceability in environmental measurements can aid in the evaluation of sample collection, storage/preservation, analytical sample preparation and quantification and lead to greater quality assurance in the measurements.

DISCLAIMER

Certain commercial equipment, instruments, and materials are identified in this paper to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply

recommendation or endorsement by NIST nor does it imply that the equipment, instruments, or materials are necessarily the best available for the purpose.

REFERENCES

1. Mason RP, Reinfelder JR, Morel FMM (1995) *Water Air Soil Pollut* 80: 915–921
2. Hoch M (2001) *Appl Geochemistry* 16:719–743
3. Vogl J (2007) *J Anal At Spectrom* 22:475-492
4. Ulberth F (2006) *Anal Bioanal Chem* 386:1121–1136
5. Davis WC, Christopher SJ, Pugh RS, Donard OFX, Krupp E a, Point D, Horvat M, Gibicar D, Kljakovic-Gaspic Z, Porter BJ, Schantz MM (2007) *Anal Bioanal Chem* 387:2335–2341
6. Wise SA, Benner BA, Christensen RG, Koster BJ, Kurz J, Schantz MM, Zeisler R (1991) *Environ Sci Technol* 25:1695–1704
7. Donais MK, Saraswati R, Mackey E, Demiralp R, Porter B, Vangel M, Levenson M, Mandic V, Azemard S, Horvat M, May K, Emons H, Wise S (1997) *Fresenius J Anal Chem* 358:424–4308
8. Davis WC, Long SE (2011) *J Anal At Spectrom* 26:431-435
9. Castillo A, Rodríguez-González P, Centineo G, Roig-Navarro AF, García Alonso JI (2010) *Anal Chem* 82:2773–2783
10. Rodríguez-González P, Ruiz-Encinar JR, García Alonso JI, Sanz-Medel A (2004) *J Anal At Spectrom* 19: 767-772
11. Rodríguez González P, García Alonso JI (2013) *Isotope Dilution Mass Spectrometry*, (The Royal Society of Chemistry) Cambridge, UK
12. ISO (1993) *Guide to the expression of uncertainty in measurement*. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.

TABLES

Table 1. Instrumental parameters of the GC-ICP/MS system employed.

	<i>NIST</i>	<i>University of Oviedo</i>
ICP-MS	Thermo X7	Agilent 7500ce
Carrier Gas		1.12 L min ⁻¹
Interface temperature	275 °C	275 °C
Integration time	50 ms	0.04 s
Ions Monitored (m/z)	119, 120, 198, 200, 202	119, 120, 198, 199, 200, 201, 202
Gas Chromatograph	Trace GC Ultra	Agilent 6890N
Initial temperature	80 °C	60 °C (Hg); 50 °C (Sn)
Initial time	3 min	1 min
Ramp rate	25 °C min ⁻¹ to 200°C; 70 °C min ⁻¹ to 280 °C;	40 °C min ⁻¹
Final temperature	280 °C	250 °C
Final time	3 min	1 min
Carrier Gas	Helium	Helium
Column head pressure		15 psi
Injector temperature	280 °C	250 °C
Carrier gas flow	1.5 mL min ⁻¹	
Volume of injection	1 µL	2 µL

Table 2. Mass fraction (µg Hg g⁻¹) of MeHg, Hg(II), and total Hg (THg) obtained for the Certified Reference Material DOLT-4 (Dogfish Liver). Methylation (% Hg(II) to MeHg), and Demethylation (% MeHg to Hg(II)) percentages are also given for each sample. Uncertainty of each replicate is expressed as 1s standard deviation of n=3 independent GC-ICP-MS injections.

MW Program	Rep.	MeHg	Hg(II)	THg	% Methylation	% Demethylation
70 °C 4 min	1	1.37 ± 0.02	1.05 ± 0.02	2.42 ± 0.02	0.93±0.33	4.66±0.57
	2	1.35 ± 0.02	0.99 ± 0.04	2.33 ± 0.06	1.40±1.25	4.15±0.82
70 °C 8 min	1	1.36 ± 0.02	1.09 ± 0.01	2.45 ± 0.03	1.03±0.31	3.29±0.40
	2	1.34 ± 0.04	1.06 ± 0.02	2.39 ± 0.03	0.92±0.88	4.00±0.23
Certified Values		1.33 ± 0.12		2.58 ± 0.22		

Table 3. Mass fraction of MeHg, Hg(II), MBT, DBT, and TBT (μg of Hg or Sn per kg^{-1}), obtained in SRMs 1974b and 1974a by NIST. The uncertainties associated with the average measured values are expressed as expanded uncertainties at the approximately 95 % level of confidence.

Material	MeHg	Hg(II)	MBT	DBT	TBT
SRM 1974a	8.96 ± 0.55	10.16 ± 1.35	--	--	--
<i>Certified values</i>	8.80 ± 0.35	11.3^a	--	--	--
SRM 1974b	7.45 ± 0.64	9.37 ± 1.22	0.93 ± 0.12	2.77 ± 0.59	6.06 ± 0.53
<i>Certified values</i>	7.05 ± 0.44	9.95^a	0.93 ± 0.06	2.74 ± 0.38	6.58 ± 0.19

^a The certified value for Hg(II) was calculated by difference of the certified mass fraction of total mercury and methylmercury.

Table 4. Mass fraction of MeHg, Hg(II), and THg MBT, DBT, and TBT obtained from the participating laboratories and certified values for SRM 1974c. The uncertainties associated with the average measured values are expressed as expanded uncertainties at the approximately 95 % level of confidence.

μg of Hg or Sn per kg^{-1} of wet mass

	Total Hg	Hg(II)	MeHg	MBT	DBT	TBT
NIST	$18.4 \pm 0.9^*$	10.93 ± 0.84	7.47 ± 0.40	1.17 ± 0.12	3.16 ± 0.37	5.21 ± 0.28
University of Oviedo	$17.68 \pm 1.46^*$	9.43 ± 1.59	8.25 ± 0.17	0.97 ± 0.15	2.88 ± 0.41	5.10 ± 0.10
Certified Values	19.70 ± 0.62^a	9.94 ± 3.0^b	8.21 ± 1.4^b	1.06 ± 0.28^b	2.97 ± 0.67^b	5.14 ± 0.68^b
Coverage factor (k)	1.96	2.00	2.14	2.00	2.02	2.14

* Σ of individual species measurements

^(a) The certified value reported on a wet-mass basis results from measurements obtained using one ICP-MS primary analytical technique.

^(b) Each certified value reported on a wet-mass basis results from combining measurements obtained using two analytical techniques based on GC-ICP-MS

D.2. Medida de especies de Hg en muestras humanas y estudio de la distribución de dichas especies en el organismo.

Artículo científico III

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 36 (2016) 16–21

Evidence of the direct adsorption of mercury in human hair during occupational exposure to mercury vapour

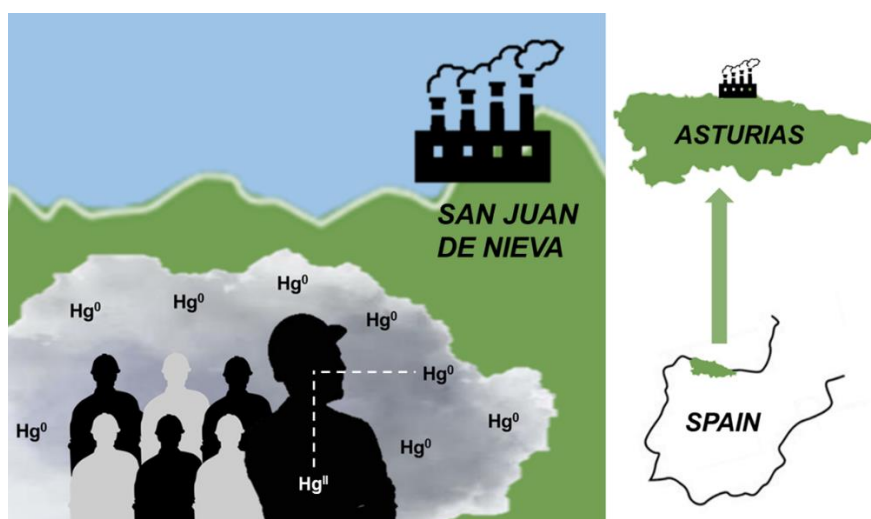
Silvia Queipo Abad, Pablo Rodríguez González and José Ignacio García Alonso

Artículo científico IV

Science of the Total Environment 672 (2019) 314–323

Concentration of mercury species in hair, blood and urine of individuals occupationally exposed to gaseous elemental mercury in Asturias (Spain) and its comparison with individuals from a control group formed by close relatives

Silvia Queipo Abad, Pablo Rodríguez González, Eduardo Martínez-Morillo, W. Clay Davis and José Ignacio García Alonso



D.2.1. Introducción

El mercurio (Hg) está considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como uno de los diez productos químicos que provocan mayor concienciación en la población. Debido a las diferentes fuentes de contaminación existe un interés en evaluar la exposición ocupacional, tanto como aquellas poblaciones con un elevado consumo de pescado o marisco contaminado. La tragedia de Minamata de 1956 reveló los graves efectos neurotóxicos del MeHg en niños y bebés.¹¹⁴ Los procesos de combustión, la industria de la fundición o la extracción de oro artesanal aumentan la exposición humana al Hg(0) vapor, especialmente en los países en desarrollo^{300,301} Otras fuentes de exposición crónica a dosis más bajas, son las amalgamas dentales constituidas por el 50% de Hg(0).¹⁰⁸ La sangre es un bioindicador clave en el análisis de las especies de mercurio en el organismo, a pesar de que la toma de muestra es un inconveniente cuando se realizan estudios a gran escala.³⁰² Esta limitación, ha llevado a muchos investigadores a seleccionar biomonitores cuya recogida es no invasiva, como es el caso de la orina o el pelo, y a partir de ellos realizar una estimación de la concentración en sangre.¹²²

Las especies químicas de Hg se comportan de diferente forma en el organismo.³⁰³ La exposición ambiental y ocupacional lleva, generalmente, a la incorporación de Hg(0) gaseoso. Una vez que es absorbido en el tracto respiratorio y pasa a la sangre, el Hg(0) se transforma en Hg(II) por reacción con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) mediada por la enzima catalasa.^{72,83} Por tanto, sería esperable encontrar un aumento de la concentración de Hg(II) en sangre tras la exposición a Hg(0), y de hecho, muchos estudios han empleado valores de HgT tanto en sangre, como orina y pelo como biomonitores de la exposición a Hg(0).^{304–306} En la orina es común emplear HgT como indicador de Hg(II),^{307,308} ya que se sabe que a través de la orina se excreta casi exclusivamente Hg(II) con niveles de hasta un 10% de MeHg.^{73,303} Por otro lado, la exposición a MeHg a través del consumo de pescado se ha evaluado tradicionalmente en HgT en sangre y pelo.^{300,301,307,309–311} Estos estudios se basan en que la especie de Hg mayoritaria en estos bioindicadores el MeHg. Sin embargo esta hipótesis, aunque es válida en muchos de los casos de estudio, no siempre es correcta, ya que hay diversos factores que pueden modificar las concentraciones de las especies.³¹² Ejemplo de ello es el incremento de la concentración de

MeHg en sangre tras una exposición a Hg(0) gaseoso.^{108,313–315} Varios estudios han mostrado también una correlación entre el MeHg en sangre o pelo y el Hg(II) excretado a través de la orina.^{91,96,316,317} Por tanto, el Hg(II) en orina no puede asociarse exclusivamente a la exposición a Hg(0). Debido a esto los métodos de cuantificación a través de la especiación de Hg se hacen imprescindibles para su correcto estudio toxicológico en el organismo.³¹⁸

En 2012, varios trabajadores que realizaban labores de mantenimiento en un intercambiador de calor fueron expuestos a altos niveles de Hg elemental. El accidente ocurrió entre el 19 de noviembre y el 3 de diciembre de 2012, en una fábrica de zinc situada en Castrillón (Asturias). Algunos de los trabajadores fueron trasladados al hospital con síntomas evidentes de envenenamiento agudo por Hg. En los días siguientes, se pudo concluir que alrededor de 50 trabajadores se vieron afectados por la intoxicación por Hg debido a los elevados niveles de HgT en sangre que presentaban. A pesar de que los trabajadores, estaban provistos de los correspondientes equipos de protección individual, especiales para Hg, los niveles de HgT en la sangre para estos trabajadores superaban los límites biológicos recomendados para la exposición ocupacional de 15 ng Hg ml⁻¹ de sangre.³¹⁹ En siete de los individuos, quienes mostraron claros síntomas de intoxicación aguda, se alcanzaron niveles de entre 500 y 900 ng Hg ml⁻¹.³²⁰ De acuerdo a esto se concluyó que los trabajadores habían sido sometidos a altas concentraciones de Hg gaseoso y que la principal vía de exposición era la respiratoria.

Varios meses tras el accidente, se tomaron muestras a cuatro de los trabajadores intoxicados con el objetivo de evidenciar la exposición a Hg(0). Debido a las características en la composición del pelo, rica en grupos -SH, cabe esperar que se dé una adsorción oxidativa, como ocurre con Hg(0), sobre carbón activado.³²¹ Una digestión de la muestra de pelo, no permitiría diferenciar entre el Hg(II) exógeno, adsorbido de forma externa y el Hg(II) endógeno que procede de la sangre. Un análisis longitudinal del pelo mediante Ablación Láser ICP-MS, puede proporcionar información sobre las fechas de exposición.²⁸⁷ Además, la ablación láser en una sección de una sola hebra de pelo permite determinar si el Hg ha sido adsorbido en la zona externa del pelo o si se ha depositado en homogéneamente de forma endógena. Se empleó azufre (³⁴S) como estándar interno, ya que su concentración es aproximadamente constante a lo

largo del pelo, y se midió la relación $^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$ para determinar la incorporación de Hg en función de la distancia a la raíz.^{287,322} Este análisis se complementa con el análisis de especiación por dilución isotópica, que permite conocer la naturaleza de cada una de las especies.

Con el objetivo de aplicar la metodología, previamente desarrollada de IDMS con trazador triple, se tomaron muestras de pelo, sangre y orina a 17 de los individuos intoxicados. Este estudio incluyó también un grupo control formado por sus familiares más cercanos. Las concentraciones del grupo control se utilizaron para evaluar si la carga de Hg presente en los individuos intoxicados, tres años después de la exposición, se debe a los efectos del propio accidente o a factores ambientales o relacionados con el estilo de vida. La metodología aplicada permitió la determinación simultánea de Hg(II), MeHg y EtHg en cada bioindicador (sangre, orina y pelo).

D.2.2. Objetivos

- Análisis longitudinal del pelo que permita observar el momento temporal en que se produce la intoxicación además de un análisis de una sección de pelo para localizar la mayor concentración de mercurio y determinar si el origen es exógeno o endógeno
- Análisis de especiación en las muestras de pelo más próximas al accidente para determinar la proporción de las especies y poder discriminar en función de ellas el origen del Hg.
- Aplicación del método de Dilución Isotópica con trazador triple en muestras de sangre, orina y pelo de 17 individuos intoxicados y 10 familiares cercanos a ellos.
- Evaluación de las concentraciones de especies de Hg en cada unos de los bioindicadores para discriminar fuentes de exposición.
- Comparativa con las concentraciones encontradas en las muestras de familiares para discriminar entre factores ambientales o relacionados con la dieta, y exposición ocupacional.

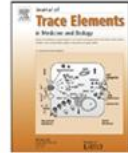
D.2.3. Artículo Científico III

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 36 (2016) 16–21



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Trace Elements in Medicine and Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jtemb

Evidence of the direct adsorption of mercury in human hair during occupational exposure to mercury vapour



Silvia Queipo Abad, Pablo Rodríguez-González, J. Ignacio García Alonso*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 June 2015

Received in revised form 29 February 2016

Accepted 22 March 2016

Keywords:

Mercury poisoning

Hair analysis

Laser ablation ICP-MS

GC-ICP-MS

ABSTRACT

We have found clear evidence of direct adsorption of mercury in human hair after the occupational exposure to mercury vapour. We have performed both longitudinal analysis of human hair by laser ablation ICP-MS and speciation analysis by gas chromatography ICP-MS in single hair strands of 5 individuals which were occupationally exposed to high levels of mercury vapour and showed acute mercury poisoning symptoms. Hair samples, between 3.5 and 11 cm long depending on the individual, were taken ca. three months after exposure. Single point laser ablation samples of 50 µm diameter were taken at 1 mm intervals starting from the root of the hairs. Sulfur-34 was used as internal standard. The ratio $^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$ showed a distinct pattern of mercury concentration with much lower levels of mercury near the root of the hair and high levels of mercury near the end of the hair. In all cases a big jump in the concentration of mercury in hair occurred at a given distance from the root, between 32 and 42 mm depending on the individual, with a high and almost constant concentration of mercury for longer distances to the root. When we took into account the rate of hair growth in humans, 9–15 mm/month, the jump in mercury concentration agreed approximately with the dates when the contamination occurred with the new growing hair showing much lower mercury concentration. In some cases the concentration of mercury at the tip of the hair was ca. 1000 times higher than that near the root. Additionally, speciation studies confirmed that mercury in all hair samples was present as inorganic mercury. The only explanation for these results was the direct adsorption of mercury vapour in hair at the time of exposure.

© 2016 Published by Elsevier GmbH.

1. Introduction

Between November 19th and December 3rd 2012 seven workers doing maintenance work in a heat exchanger from a multinational zinc manufacturer located in Avilés (Asturias, Spain) were taken to hospital with acute mercury poisoning. In the next few days it was established that more than 50 workers from the same subcontracting company were exposed to dangerous mercury levels when cutting pipes in a heat exchanger. The total mercury levels in blood for these 50 workers were well in excess of the recommended biological limit values for occupational exposure of 10 ng Hg/ml of blood [1] and reached levels between 500 and 900 ng Hg/ml for the seven workers which showed acute poisoning symptoms [2]. Fortunately, none of these workers died after exposure in contrast to another similar accident that occurred in Japan in 1993 where three workers died after acute mercury poisoning [3]. During February–March 2013 several of the workers which showed acute mercury

poisoning approached the University of Oviedo for an independent assessment of their mercury exposure levels. It was decided to carry out longitudinal hair analysis by laser ablation-ICP-MS as previous studies [4] have shown that, after acute exposure to inorganic mercury, mercury accumulates in hair and the longitudinal concentration profile of mercury can give information about the dates of exposure. These data would be complementary to the blood and urine analyses which were carried out routinely at different time intervals after their exposure.

The total concentration of mercury in human hair has been traditionally employed to assess environmental exposure [5]. Particularly, the exposure to methylmercury through the diet can be assessed by measuring total mercury in hair [5] which concentration is ca. 250 times higher than that in blood [6]. Additionally, occupational exposure to mercury vapour [7] or oral mercury poisoning with HgO [4] could be also detected in hair. Laser ablation ICP-MS has been employed for the determination of mercury in human hair [4,8] and sulphur was employed as internal standard in both publications. The constant concentration of sulphur in hair (ca. 5% w/w) makes it suitable for internal standardisation and correction for the variability of laser ablation sampling. Both single

* Corresponding author.

E-mail address: jiga@uniovi.es (J.I. García Alonso).<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.03.012>

0946-672X/© 2016 Published by Elsevier GmbH.

Evidence of the direct adsorption of mercury in human hair during occupational exposure to mercury vapour.

Silvia Queipo Abad, Pablo Rodríguez-González and J. Ignacio Garcia Alonso*

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

*Author for correspondence: jiga@uniovi.es

ABSTRACT

We have found clear evidence of direct adsorption of mercury in human hair after the occupational exposure to mercury vapour. We have performed both longitudinal analysis of human hair by laser ablation ICP-MS and speciation analysis by gas chromatography ICP-MS in single hair strands of 5 individuals which were occupationally exposed to high levels of mercury vapour and showed acute mercury poisoning symptoms. Hair samples, between 3.5 and 11 cm long depending on the individual, were taken ca. three months after exposure. Single point laser ablation samples of 50 µm diameter were taken at 1 mm intervals starting from the root of the hairs. Sulfur-34 was used as internal standard. The ratio $^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$ showed a distinct pattern of mercury concentration with much lower levels of mercury near the root of the hair and high levels of mercury near the end of the hair. In all cases a big jump in the concentration of mercury in hair occurred at a given distance from the root, between 32 and 42 mm depending on the individual, with a high and almost constant concentration of mercury for longer distances to the root. When we took into account the rate of hair growth in humans, 9–15 mm/month, the jump in mercury concentration agreed approximately with the dates when the contamination occurred with the new growing hair showing much lower mercury concentration. In some cases, the concentration of mercury at the tip of the hair was ca. 1000 times higher than that near the root. Additionally, speciation studies confirmed that mercury in all hair samples was present as inorganic mercury. The only explanation for these results was the direct adsorption of mercury vapour in hair at the time of exposure.

KEYWORDS

Mercury poisoning, Hair analysis, Laser Ablation ICP-MS, GC-ICP-MS.

1. INTRODUCTION

Between November 19th and December 3rd 2012, seven workers doing maintenance work in a heat exchanger from a multinational zinc manufacturer located in Avilés (Asturias, Spain) were taken to hospital with acute mercury poisoning. In the next few days it was established that more than 50 workers from the same subcontracting company were exposed to dangerous mercury levels when cutting pipes in a heat exchanger. The total mercury levels in blood for these 50 workers were well in excess of the recommended biological limit values for occupational exposure of 10 ng Hg mL⁻¹ of blood [1] and reached levels between 500 and 900 ng Hg mL⁻¹ for the seven workers which showed acute poisoning symptoms [2]. Fortunately, none of these workers died after exposure in contrast to another similar accident that occurred in Japan in 1993 where three workers died after acute mercury poisoning [3]. During February-March 2013 several of the workers which showed acute mercury poisoning approached the University of Oviedo for an independent assessment of their mercury exposure levels. It was decided to carry out longitudinal hair analysis by Laser Ablation-ICP-MS as previous studies [4] have shown that, after acute exposure to inorganic mercury, mercury accumulates in hair and the longitudinal concentration profile of mercury can give information about the dates of exposure. These data would be complementary to the blood and urine analyses which were carried out routinely at different time intervals after their exposure.

The total concentration of mercury in human hair has been traditionally employed to assess environmental exposure [5]. Particularly, the exposure to methylmercury through the diet can be assessed by measuring total mercury in hair [5] which concentration is ca. 250 times higher than that in blood [6]. Additionally, occupational exposure to mercury vapour [7] or oral mercury poisoning with HgO [4] could be also detected in hair. Laser Ablation ICP-MS has been employed for the determination of mercury in human hair [4,8] and sulfur was employed as internal standard in both publications. The constant concentration of sulfur in hair (ca. 5% w/w) makes it suitable for internal standardisation and correction for the variability of laser ablation sampling. Both single point [8] and line scans [4] were employed and, given the small diameter of the human hair, spot sizes below 50 µm were used [4,8].

In this work we have applied the methodology described previously [4,8] to the study of the longitudinal variation of mercury in single hair strands of occupationally exposed workers. Mercury was detected at mass 202 and sulfur-34 was employed as internal standard. Quantification of mercury was not attempted by LA-ICP-MS as only the mercury/sulfur signal ratio was employed to assess mercury incorporation in hair as a function of the distance to the root of the hair. Additionally, after laser ablation the hair samples were digested, derivatized and measured by GC-ICP-MS to gain speciation information.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Hair samples

Samples were collected by extracting 2-4 hairs from the back of the head of the workers with the help of stainless-steel flat tip tweezers. Hair samples were taken from 5 of the individuals who suffered from acute mercury poisoning. Samples 1 to 3 were taken on 26/02/2013 while samples 4 and 5 were taken on 12/03/2013. The hairs were stored immediately in plastic zip-lock bags and identified with the name of the worker and the date of collection. For analysis, hair samples were mounted on 25 x 50 mm microscopic glass slides and fixed with two-sided tape. The hair samples were cut every ca. 4 cm while mounting on the slides to fit in the laser ablation chamber. The distance to the root was established with the coordinates of each laser ablation point. No pre-treatment of the hair samples was performed.

2.2. Solid-liquid extraction in hair samples for GC-ICP-MS analysis

The direct digestion of the samples in the glass slides were performed by focussed microwaves in a microwave unit Explorer Hybrid from CEM Corporation (Matthews, NC, USA). The hair samples were treated with 25% tetramethylammonium hydroxide (TMAH) (Sigma-Aldrich) for 4.5 min at a fixed power of 35 W. After digestion the resultant supernatant was transferred to a vial containing 4 mL of acetic acid/sodium acetate buffer (pH 4). For derivatization, 0.8 mL of a 2% w/v sodium (tetra-n-propyl)borate (LGC-Standards, Wesel, Germany) in Milli-Q water and 1 ml of hexane (Sigma-Aldrich) were added for liquid-liquid extraction. The derivatization and extraction into hexane were accomplished by five minutes of manual shaking. Then, the sample was centrifuged (5000 rpm for 5 min), and the organic layer was transferred to a glass vial and stored at -18 °C until analysis. Just before the GC-ICP-MS injection of the samples an additional step of pre-concentration under a gentle stream of nitrogen was carried out in a dedicated unit (Minivap, Supelco, Bellefonte PA). The samples were pre-concentrated until a final volume of approximately 20 µL.

2.3. Instrumentation

A CETAC-LSX-213 laser system (Cetac Technologies, Omaha, USA) with helium as carrier gas was employed. Laser energy was 20% of nominal and the repetition rate selected was 10 Hz. Measurements were performed by single point analysis with a spot size of 50 µm and a total of 100 laser ablation shots per point (ca. 10 s ablation times). A 10 seconds delay was selected

from the start of the measurements to get background data before the ablation peak. Single point measurements were carried out every 1 mm from the root to the tip of the hair. The laser ablation was coupled to an Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) ICP-MS instrument. Masses 34 for sulfur and 202 for mercury were measured with 0.1 s integration time using the time-resolved software of the instrument. A total acquisition time of 60 seconds was selected. Raw data were taken to Microsoft Excel for further treatment. Experimental conditions employed in the LA-ICP-MS analyses are given in Table 1. The chromatographic separation of the propylated forms of MeHg, EtHg and Hg(II) was accomplished with a gas chromatograph model Agilent 6890N (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) fitted with an split/splitless injector and a DB-5MS capillary column from Agilent J&W Scientific (cross-linked 5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane, 30 m × 0.53 mm i.d. × 1.0 μm). The gas chromatograph was coupled to the Agilent 7500ce ICP-MS using a laboratory-made transfer line. The volume of injection for the four samples was 2 μL of the preconcentrated solution.

2.4. Data treatment

Peak areas were calculated both for ^{34}S and ^{202}Hg for each data point after background subtraction using the first and the last 10 seconds in each measurement point to calculate the baseline. This procedure is illustrated in Figure 1 for one of the data points taken at 20 mm from the root of hair 1. The reconstructed baselines, shown as the two dashed lines in Figure 1, were subtracted from the whole data set. After background subtraction peak areas both for ^{202}Hg (red line) and ^{34}S (black line) were calculated by the trapezoidal method using the whole data set. The ratio of peak areas $^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$ was used in the longitudinal analysis of the data. For the data point shown in Figure 1 the ratio of peak areas was 0.0122.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Suitability of ^{34}S as internal standard.

The use of ^{34}S as internal standard for the determination of mercury in single hair strands was suggested previously [4,8]. In order to check its suitability and to study the stability of ^{34}S measurements with time we have taken all peak area measurements for ^{34}S performed on the 5 hair samples and plotted them in Figure 2. Please note that every hair sample was measured on different days and under slightly different experimental conditions. As can be observed, for each hair sample the measured areas were fairly constant during a measurement session apart from a few outliers. However, differences in sensitivity from one sample to another were quite large with more than one order of magnitude difference between hairs 3 and 4. Unfortunately, none of the hair samples were measured again on a different day so we do not know whether these

differences were due to measurement conditions in the ICP-MS or actual sulfur concentration differences between hair samples of different individuals. In any case, the suitability of ^{34}S as internal standard for each hair sample is demonstrated. However, it is worth stressing that these measurements cannot be used to compare mercury concentrations in the different hair samples.

3.2. Ablation peak profiles.

We observed two general types of peak profiles in all measured hairs. For data points near the root of the hair the peak profiles for all hairs were similar to those shown in Figure 1. It seems that the concentration of sulfur and mercury were constant throughout the diameter of the hairs. On the other hand, peaks further away from the root in three of the hair samples (hairs 1, 2 and 4) showed a distinct and very intense double peak for mercury such as that shown in Figure 3 for hair 1 at 51 mm from the root. Please note that, for this point, the area of the mercury signal is about 1000 times higher than that in Figure 1 for the same hair sample and with similar sensitivities and peak profiles for sulfur. Figure 4 shows a detail photograph of hair 5 after ablation. All the other hairs showed similar images. As can be observed, the different ablation spots occur at exactly 1 mm intervals. The ablation starts at the upper surface of the hair, goes through its core and finally ablates the lower surface of the hair which is fixed to the glass slide by a two-sided tape. The final effect of the ablation process is the cutting of the hair in two at the ablation spot. When observing the mercury peak profile in Figure 3 it seems to indicate that this element is concentrated in the surface of the hair with lower concentrations towards its core. The surface of the hair was ablated both at the beginning and at the end of the laser ablation burst of 100 shots which explains the double peak obtained. Finally, Figure 5 shows the mercury peak profiles for hairs 2 and 4 both at a zone of low mercury concentration near the root of the hair (left axis) and at another zone of high mercury concentration near the tip of the hair (right axis). As can be observed, the peak profiles are very similar to those already discussed for hair 1.

3.3. Longitudinal analysis of mercury in hair.

Figure 6 shows all the results obtained for the 5 hair samples in terms of ratio of peak areas ($^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$) vs. distance to the root (mm). Please note that the results are expressed in logarithmic scale to show better the differences between the different hair samples. In all samples, the ratio of peak areas between mercury and sulfur is low near the root of the hairs (values between 0.01 and 0.1) and then there is a drastic increase in the ratio of peak areas at certain distances from the root depending on the particular hair sample. Hairs 1, 2 and 4 show near three orders of magnitude of difference in the ratio of peak areas near the tip of the hair in comparison to data near the root. The sample from hair 3 was probably too short to see the increase in concentration of mercury and the results for hair 5 need some explanation. Hair 5 was ca. 300 mm long and only the first 100 mm were measured. The owner kept the hair bundled in a ponytail

which could have prevented the mercury vapour to attach to the hair in the same way as for hairs 1, 2 and 4 where the hair was kept loose. Anyway, we still observe a jump in the concentration of mercury in hair 5 about 42 mm from the root with some random spikes at longer distances where parts of the hair may have been more exposed than others to mercury vapour. If we assume a hair growth rate of between 9 and 15 mm per month depending on the individual [9] the “jumps” in mercury concentration for samples 1, 2, 4 and 5 are in good agreement with the dates when the accident took place (end of November - beginning December 2012). The higher relative concentrations of mercury appear in the part of the hair that was already exposed at the time of the accident while the new hair which grew afterwards showed much lower mercury content. This can only be explained if mercury vapour was adsorbed into the hairs in a non-reversible way during the accident. This adsorbed mercury stayed in the hair and could not be removed even by repeated washing. Please note that the hair samples were taken between three and three and a half months after the accident. Luckily 4 out of the 5 individuals tested had hair long enough to see the change in mercury concentration along their hairs.

3.4. Mercury speciation

A typical GC-ICP-MS profile for mercury in hair for a person which has not been occupationally exposed to mercury is shown in Figure 7. As can be observed, the main peak corresponds to methylmercury with a minor peak for inorganic mercury. This behaviour is typical when mercury appears in hair as a consequence of the presence of mercury in the diet. The GC-ICP-MS profile for three of the hairs studied (hairs 1, 2 and 4) are shown in Figure 8 (A, B and C respectively). As can be observed now, the main peak corresponds to inorganic mercury in all cases with a small peak for methylmercury. These results confirm the non-reversible adsorption of mercury vapour on these human hair samples found by longitudinal analysis using Laser Ablation.

4. CONCLUSIONS

The fact that mercury vapour can be irreversibly adsorbed on human hair was suggested by Wilhelm *et al.* [7] when analyzing hair of practicing dentists using mercury amalgams. Experiments to test this fact were devised by Li *et al* [10] who proposed mercury in hair as an indication of occupational exposure to mercury vapour. Our results here confirm these previous studies and show that mercury concentrations in exposed hair can be up to 1000 times higher than the mercury which does go into the hair as a consequence of ingestion or lung absorption. The jumps in the concentration of mercury, for 4 of the analyzed hairs, appeared at distances from the root which were well in agreement with the dates of mercury contamination and allowed us to demonstrate the cause-effect relationship of the intoxication. GC-ICP-MS studies confirmed

the presence of inorganic mercury in the hair samples. Another conclusion of this work is that data on mercury concentrations in hair after occupational exposure should be taken with extreme care as the possibility of hair contamination by direct adsorption of mercury vapour from the atmosphere cannot be ruled out.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the MICINN (project CTQ-2012-36711, co-funded by FEDER).

REFERENCES

- [1] Scientific Committee on Occupational Exposure Limits. "List of recommended health-based biological limit values (BLVs) and biological guidance values (BGVs)".
<http://ec.europa.eu/social/BlobServlet?docId=12629&langId=en>.
- [2] V. Rodríguez. "Exposición a mercurio en Asturias. 2013". Consejería de Sanidad. Principado de Asturias, 2013.
- [3] S. Asano, K. Eto, E. Kurasaki, H. Gunji, K. Hiraiwa, M. Sato, H. Sato, M. Hasuike, N. Hagiwara, H. Wakasa. "Acute inorganic mercury vapour inhalation poisoning". *Pathology International*, 2000, 50, 169-174.
- [4] C. Stadlbauer, T. Prohaska, C. Reiter, A. Knaus, G. Stingeder. "Time-resolved monitoring of heavy-metal intoxication in single hair by laser ablation ICP-DRCMS". *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, 38, 500-508
- [5] D. Airey. "Mercury in human hair due to environment and diet: A review". *Environ. Health Perspect.*, 1983, 52, 303-316.
- [6] E. Budtz-Jorgensen, P. Grandjean, P.J. Jorgensen, P. Weihe, N. Keiding. "Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages". *Environ. Res.*, 2004, 95, 385-393
- [7] M. Wilhelm, F. Müller, H. Idel. "Biological monitoring of mercury vapour exposure by scalp hair analysis in comparison to blood and urine". *Toxicology Letters*, 1996, 88, 221-226.
- [8] M. Legrand, R. Lam, M. Jensen-Fontaine, E. D. Salin, H. M. Chan. "Direct detection of mercury in single human hair strands by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS)". *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 1287-1288.
- [9] I.M. Kempson, E. Lombi. "Hair analysis as a biomonitor for toxicology, disease and health status". *Chem. Soc. Rev.* 2011, 40, 3915-3940.
- [10] P. Li, X. Feng, G. Qiu, Q. Wan. "Hair can be a good biomarker of occupational exposure to mercury vapor: Simulated experiments and field data analysis". *Sci. Total Environ.*, 2011, 409, 4484-4488.

TABLES

Table 1. Experimental conditions of the LA-ICP-MS instrument.**Experimental parameters ICP-MS Agilent 7500ce**

RF power	1500 W
External Ar flow	15 L·min ⁻¹
Carrier Ar flow	0.75 L·min ⁻¹

Acquisition parameters ICP-MS Agilent 7500ce

Mode	Time resolved analysis
Points per amu	1
Integration time per point	0.1 s
Measured masses	³⁴ S ⁺ , ²⁰² Hg ⁺

Instrumental parameters LA CETAC LSX-213

Laser Energy (5.6 mJ máx)	20 %
Repetition rate	10 Hz
Spot size	50 µm
Ablation mode	Single point
Helium flow	0.80 L·min ⁻¹

FIGURES

Figure 1. Laser ablation profile for ^{202}Hg (red line, right axis) and ^{34}S (black line, left axis) measured at 20 mm from the root of hair 1. The baseline data is shown as white points (sulfur) or gray points (mercury). The reconstructed baseline is shown as a black dashed line for both isotopes.

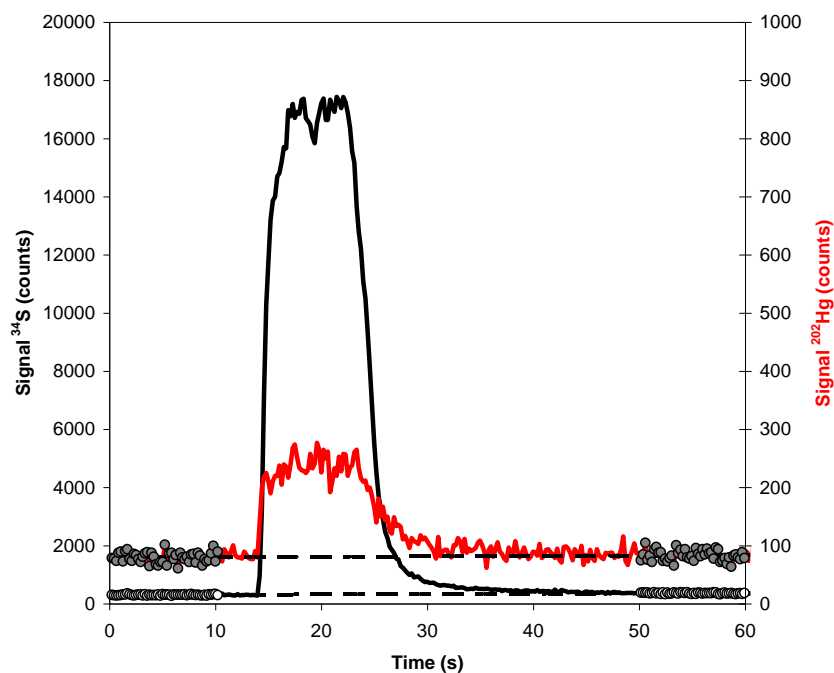


Figure 2. Peak area measurements for ^{34}S performed on the 5 hair samples and plotted versus the distance to the root for each hair sample.

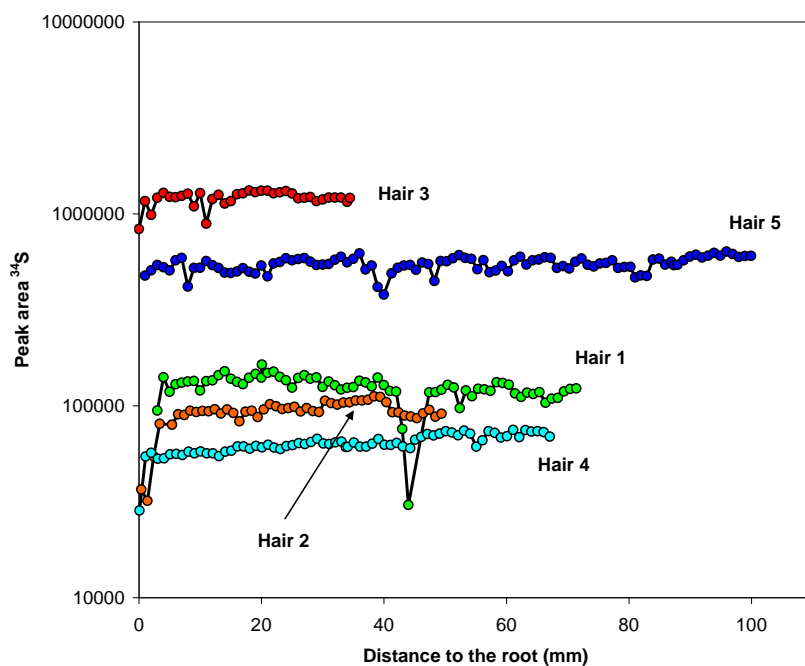


Figure 3. Laser ablation profile for ^{202}Hg (red line, right axis) and ^{34}S (black line, left axis) measured at 51 mm from the root of hair 1.

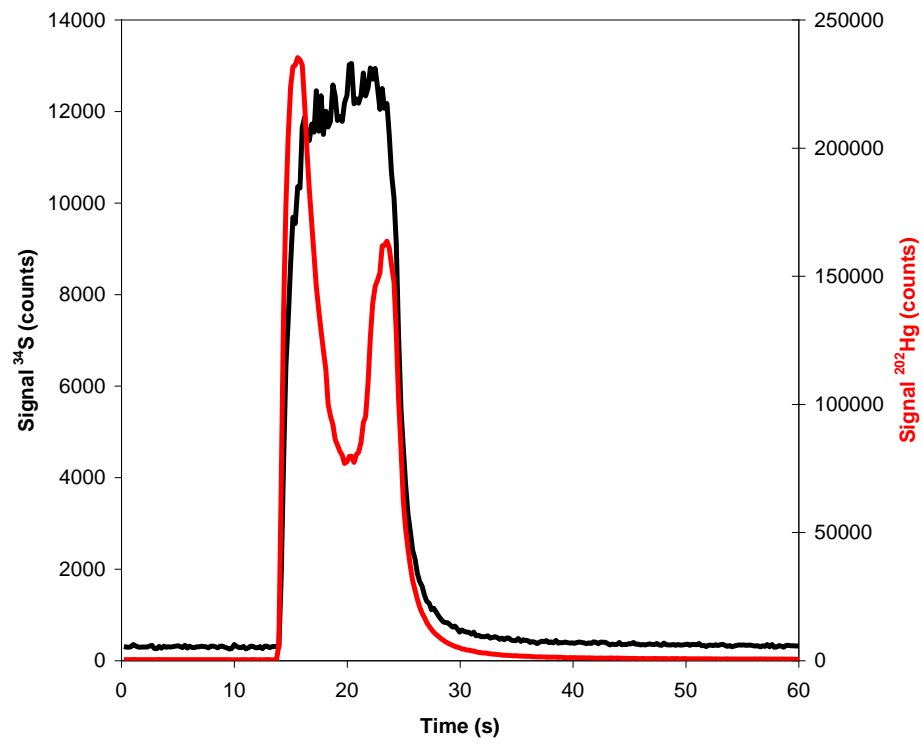


Figure 4. Photograph of hair 5 after ablation.

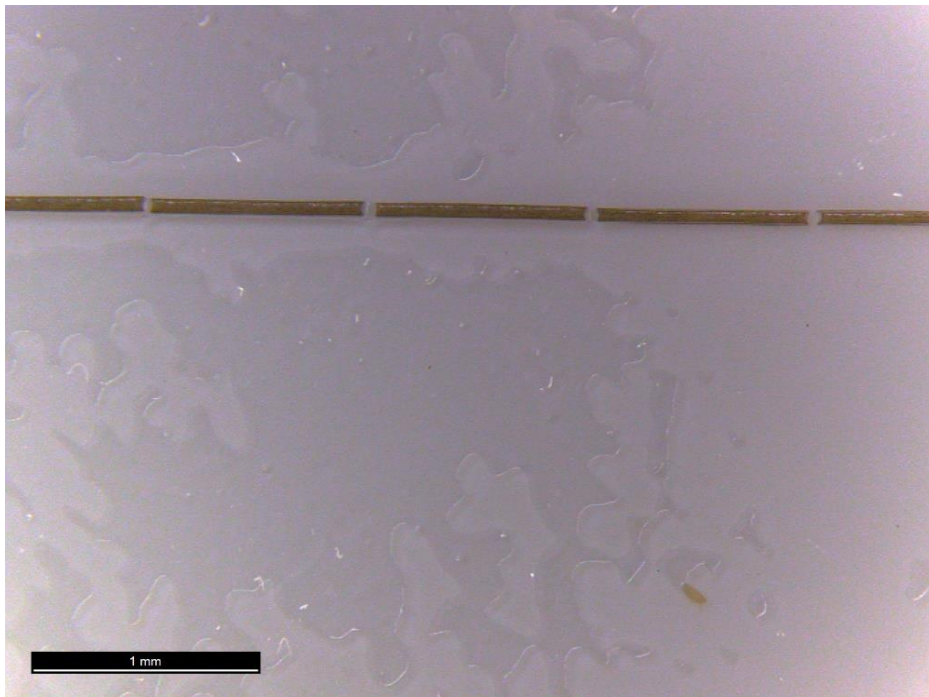
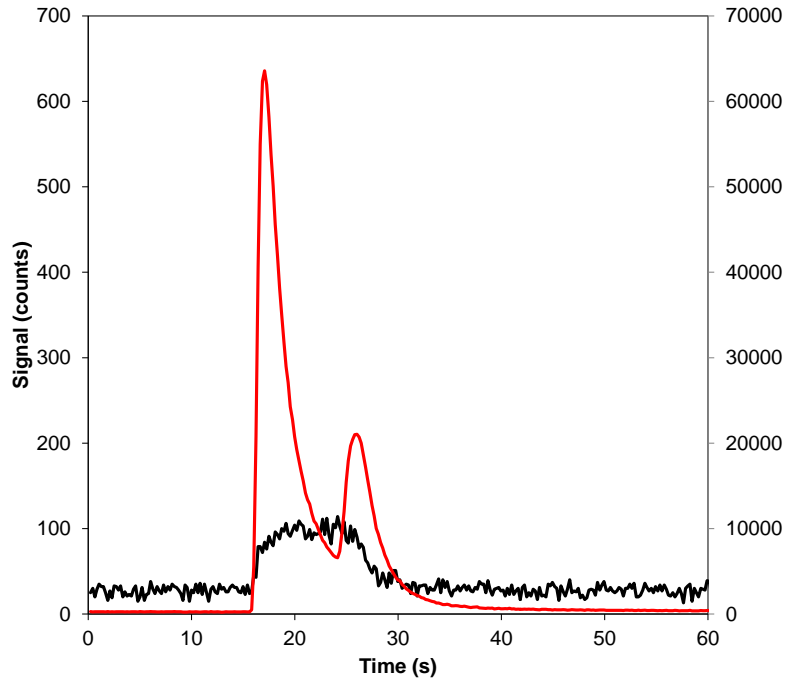


Figure 5. Peak profiles for ^{202}Hg in hair 2 (A) and hair 4 (B) in two different zones in the hair. Red line corresponds to a high concentration profile near the tip of the hair (right axis) whereas the black line corresponds to a low concentration profile near the root of the hair (left axis).

A) Hair 2.



B) Hair 4.

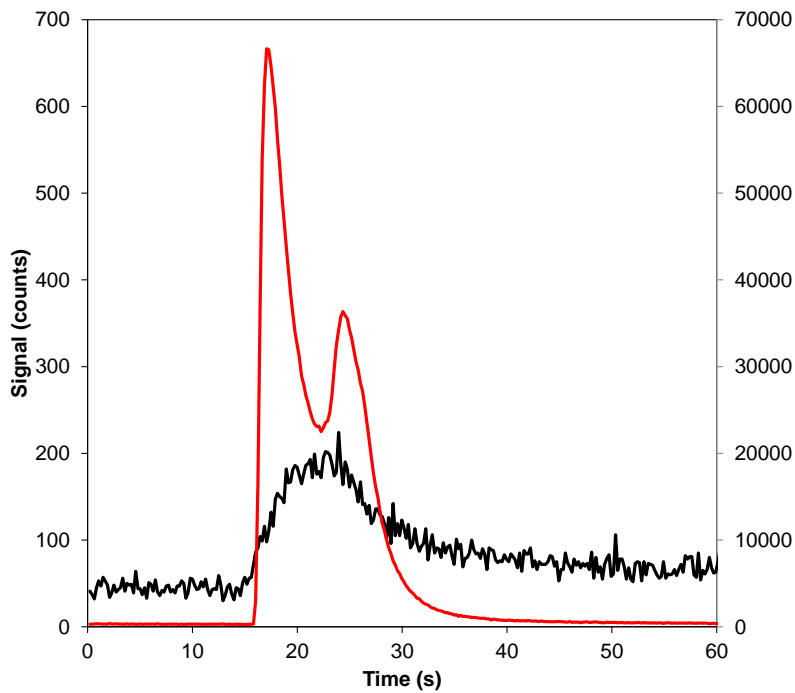


Figure 6. Ratio of peak areas ($^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$) measured for the 5 hair samples at different distances to the root for each hair sample.

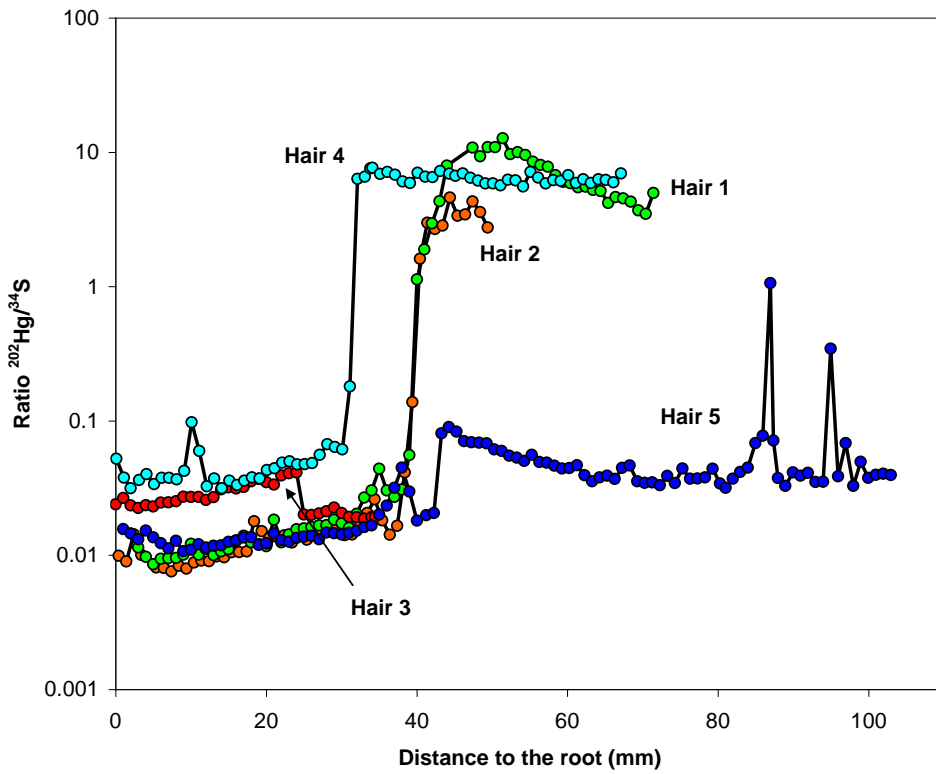


Figure 7. GC-ICP-MS chromatogram of mercury detected at mass 202 from the hair of a non-occupationally exposed individual.

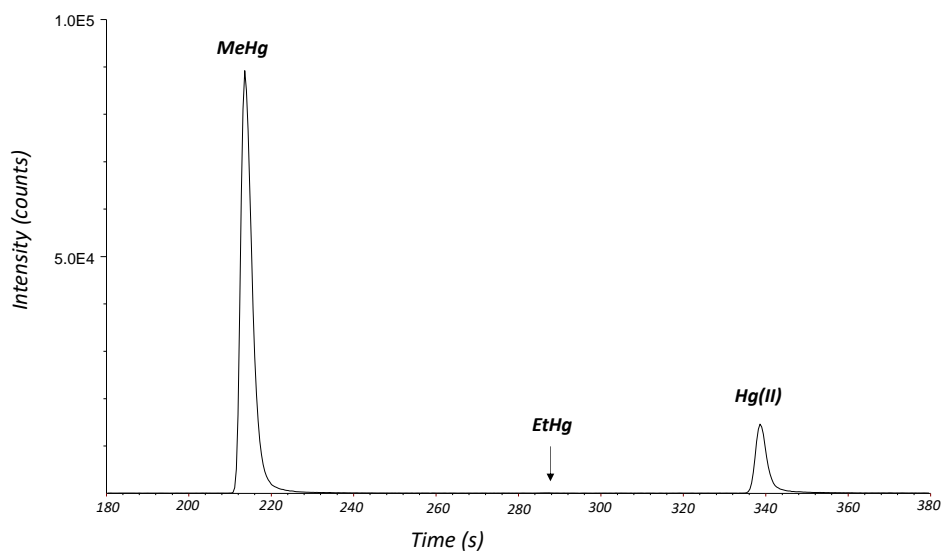
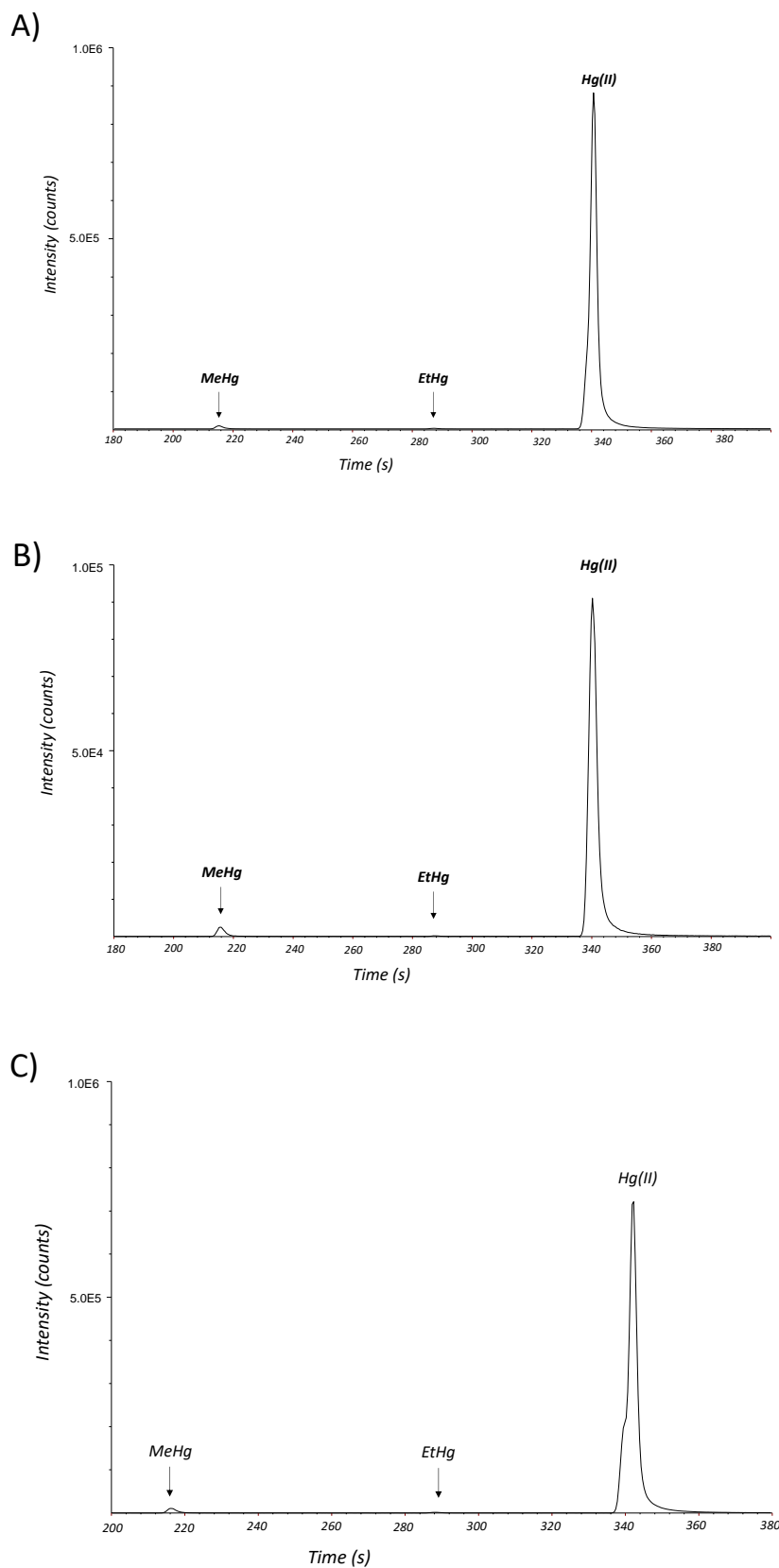


Figure 8. GC-ICP-MS chromatograms of mercury detected at mass 202 from the hairs 1 (A), 2 (B) and 4 (C).



D.2.1. Artículo Científico IV

Science of the Total Environment 672 (2019) 314–323



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Concentration of mercury species in hair, blood and urine of individuals occupationally exposed to gaseous elemental mercury in Asturias (Spain) and its comparison with individuals from a control group formed by close relatives



Silvia Queipo-Abad ^a, Pablo Rodríguez González ^{a,*}, Eduardo Martínez-Morillo ^b, W. Clay Davis ^c, José Ignacio García Alonso ^a

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

^b Service of Clinical Biochemistry, Laboratory of Medicine, Central University Hospital of Asturias (HUCA), 33011 Oviedo, Spain

^c Chemical Sciences Division, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899, USA

HIGHLIGHTS

- High MeHg levels in blood of individuals exposed to gaseous elemental mercury
- Blood MeHg in exposed individuals similar to those of heavy fish consumers
- MeHg hair to blood ratio of exposed individuals lower than that in the control group
- Total Hg levels of control group similar to gold miners and heavy fish consumers

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 January 2019

Received in revised form 22 March 2019

Accepted 23 March 2019

Available online 31 March 2019

Editor: Damia Barcelo

Keywords:

Methylmercury
Inorganic mercury
Occupational exposure
Hg distribution in humans

ABSTRACT

Between November 19th, 2012 and December 3rd, 2012, 50 workers were intoxicated with gaseous Hg in San Juan de Nieva (Asturias, Spain) during the maintenance of a heat exchanger of a zinc manufacturer. We have quantified the concentration of methylmercury (MeHg), ethylmercury (EtHg) and Hg(II) in blood, hair and urine samples of those individuals taken three years after the accident. Blood, hair and urine of their closest relatives were also analyzed to assess whether the mercury burden present in the intoxicated individuals was due to the occupational exposure or to environmental or lifestyle-related factors. The determination of the mercury species in the samples was carried out applying multiple spiking Isotope Dilution GC-ICP-MS. This procedure corrects for possible interconversion reactions between the Hg species during the sample preparation procedure. Linear correlations were observed for both groups when plotting MeHg in blood vs MeHg in hair, and MeHg in hair vs Hg(II) in urine. The concentrations of Hg species in the intoxicated individuals were not significantly different from those obtained in the control group except for MeHg in blood. Significantly higher levels of MeHg in blood were obtained in some of the intoxicated individuals who had not consumed fish or seafood since the accident. A different correlation between MeHg in hair and MeHg in blood was obtained for these individuals

* Corresponding author.

E-mail address: rodriguezpablo@uniovi.es (P.R. González).

Concentration of mercury species in hair, blood and urine of individuals occupationally exposed to gaseous elemental mercury in Asturias (Spain) and its comparison with individuals from a control group formed by close relatives.

Silvia Queipo Abad¹, Pablo Rodríguez González^{*1}, Eduardo Martínez-Morillo², W. Clay Davis³, José Ignacio García Alonso¹

¹ *Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006, Oviedo (Spain)*

² *Service of Clinical Biochemistry, Laboratory of Medicine, Central University Hospital of Asturias (HUCA), 33011, Oviedo (Spain)*

³ *Chemical Sciences Division, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland 20899, USA.*

* Author for correspondence: rodriguezpablo@uniovi.es

ABSTRACT

Between November 19th, 2012 and December 3rd, 2012, 50 workers were intoxicated with gaseous Hg in San Juan de Nieva (Asturias, Spain) during the maintenance of a heat exchanger of a zinc manufacturer. We have quantified the concentration of methylmercury (MeHg), ethylmercury (EtHg) and Hg(II) in blood, hair and urine samples of those individuals taken three years after the accident. Blood, hair and urine of their closest relatives were also analyzed to assess whether the mercury burden present in the intoxicated individuals was due to the occupational exposure or to environmental or lifestyle-related factors. The determination of the mercury species in the samples was carried out applying multiple spiking Isotope Dilution GC-ICP-MS. This procedure corrects for possible interconversion reactions between the Hg species during the sample preparation procedure. Linear correlations were observed for both groups when plotting MeHg in blood vs MeHg in hair, and MeHg in hair vs Hg(II) in urine. The concentrations of Hg species in the intoxicated individuals were not significantly different from those obtained in the control group except for MeHg in blood. Significantly higher levels of MeHg in blood were obtained in some of the intoxicated individuals who had not consumed fish or seafood since the accident. A different correlation between MeHg in hair and MeHg in blood was obtained for these individuals compared to the control group who showed a hair-to-blood ratio consistent with the reported value for people exposed to Hg via fish consumption. Our results suggest that ingested MeHg followed the same pathway of deposition in hair in exposed and non-exposed individuals. However, the exposed individuals with high MeHg levels in blood showed a significantly different extent of MeHg deposition in hair compared to the control group.

KEYWORDS

Methylmercury; Inorganic mercury; occupational exposure; Hg distribution in humans.

HIGHLIGHTS

- High MeHg levels in blood of individuals exposed to gaseous elemental mercury
- Blood MeHg in exposed individuals similar to those of heavy fish consumers
- MeHg hair to blood ratio of exposed individuals lower than that in the control group
- Total Hg levels of control group similar to gold miners and heavy fish consumers

1. INTRODUCTION

Mercury (Hg) is considered by the World Health Organization (WHO) as one of the ten chemicals of major public concern. It is a globally distributed pollutant mostly released to the atmosphere as elemental mercury ($\text{Hg}(0)_v$) by anthropogenic activities. Combustion processes, smelting industry or artisanal gold mining increase the human exposure to $\text{Hg}(0)_v$ specially in developing countries (Baeuml *et al.*, 2011; Dolbec *et al.*, 2000). Other sources of chronic exposure to low doses of Hg are dental amalgams constituted by 50% of $\text{Hg}(0)$ (Halbach *et al.*, 2008).

Hg stays in the atmosphere and enters into a dynamic biogeochemical cycle in which it is transformed into different chemical species (Selin, 2009). One of the main risks for humans is the oxidation in the atmosphere from $\text{Hg}(0)$ to inorganic mercury ($\text{Hg}(\text{II})$) and its deposition in aquatic ecosystems (Fitzgerald *et al.*, 2007). $\text{Hg}(\text{II})$ can be methylated by bacterial activity at the water-sediment interface to form methylmercury (MeHg), which is accumulated by aquatic organisms and biomagnified through the trophic chain (Mason *et al.*, 1995). MeHg is considered the highest neurotoxic form of Hg. Human exposure to MeHg is mostly due to the uptake of fish and seafood. The Minamata tragedy of 1956 revealed the high neurotoxic effects of MeHg among children (Takeuchi *et al.*, 1962).

The increase of Hg emissions into the atmosphere in the last decades has caused a great interest in the biomonitoring of different exposed populations. For this purpose, blood is the preferred bioindicator but due to the complexity of its matrix less invasive bioindicators such as urine or hair are often employed to estimate blood concentrations in large-scale studies (World Health Organization, 2015).

It is known that different Hg species follow a different pathway in the organism (Clarkson, 2002). For example, when $\text{Hg}(0)$ enters the bloodstream, it is transformed into $\text{Hg}(\text{II})$ by catalase action and H_2O_2 (Halbach and Clarkson, 1978). Thus, the exposition to $\text{Hg}(0)_v$ is expected to be

reflected by increased levels of Hg(II) in the body. Therefore, total mercury (THg) levels in urine, blood and hair are often used as biomarkers of short-term acute exposure to Hg(0)_v (Barregard *et al.*, 2006; Tsuji *et al.*, 2003; Wilhelm *et al.*, 1996). In addition, the long-term exposition to MeHg by contaminated fish uptake has been often evaluated with THg levels in blood and hair (Berglund *et al.*, 2005; Bose-O'Reilly *et al.*, 2010; Budtz-Jørgensen *et al.*, 2004; Dolbec *et al.*, 2000; Drasch *et al.*, 2001). These assumptions are not necessarily true as absorption, metabolism, accumulation, and toxicity of Hg will depend on its chemical form. Also many factors have been found to affect Hg species concentrations in hair, blood or urine (Laffont *et al.*, 2011; Laffont *et al.*, 2012).

Several studies have shown an increase in blood MeHg after Hg(0)_v exposition (Cross *et al.*, 1978; Halbach *et al.*, 2008; Ishihara *et al.*, 1977; Suzuki *et al.*, 1976). Recently, it has been demonstrated that Hg(0)_v can be exogenously adsorbed onto hair as Hg(II) (Queipo-Abad *et al.*, 2016). The characteristics of this binding procedure are not well understood yet. Considering the high sulfur content in hair, it is possible that an oxidative adsorption occurs, as it happens with Hg(0)_v onto functionalized activated carbon (Korpiel and Vidic, 1997). The external adsorption does not allow the discrimination between exogenous and endogenous Hg(II) coming from the bloodstream. In urine, THg instead of Hg(II) (Berglund *et al.*, 2005; Vahter *et al.*, 2000), has been commonly measured as it has been reported that less than 10% of MeHg is excreted in urine (Clarkson, 2002; Nuttall, 2004). However, several studies showed a correlation between MeHg in blood and Hg(II) in urine, in contrast to the established assumption that Hg(II) in urine comes from Hg(II) in blood (Dock *et al.*, 1994; Rowland *et al.*, 1977; Sherman *et al.*, 2013; Suda and Hirayama, 1992). Thus, the determination of different Hg species in the main biomonitors (blood, hair and urine) can be a valuable tool not only for assessing exposure sources, but also to better understand Hg dynamics and bioaccumulation in humans (Suzuki *et al.*, 1993).

In 2012, several workers were doing maintenance work in a heat exchanger from a zinc manufacturer in Asturias (Spain) and were exposed to high elemental Hg levels (Queipo-Abad *et al.*, 2016). The accident occurred between November 19th and December 3rd, 2012, when some of the workers were taken to hospital with obvious symptoms of acute Hg poisoning. In the following days, it could be concluded that about 50 workers were affected by Hg poisoning according to their high levels of THg in blood. It was concluded that the workers were subjected to elevated gaseous mercury concentrations and that the main exposure route was through inhalation. The evidence of the direct adsorption of Hg in hair for these individuals has been previously reported (Queipo-Abad *et al.*, 2016). In this work, we have measured the concentrations of Hg(II), MeHg and EtHg in blood, hair and urine three years after the accident. Our objective was to find possible chronic exposure biomarkers in the most common human biomonitors. The determination of the Hg species in blood, urine and hair was carried out applying a recently developed procedure based on multiple spiking Isotope Dilution Mass Spectrometry and GC-ICP-MS. This procedure enables the accurate and precise quantification of different Hg compounds while correcting for species interconversions during analysis (Queipo-Abad *et al.*,

2017). We employed this methodology for hair, blood and urine samples of 17 of the intoxicated individuals. This study included also a control group consisting of their closest relatives. The concentrations of the control group were used to assess whether the Hg burden present in the intoxicated individuals, was due to a previous occupational exposure or to environmental or lifestyle-related factors. The applied methodology allowed the simultaneous determination of Hg(II), MeHg and EtHg in each biomonitor. Thus, valuable information about the distribution of Hg species in the organism could be obtained.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Sample collection

We analyzed samples from 17 intoxicated individuals involved in the occupational accident and 10 samples from a control group constituted by the closest relatives of 10 out of 17 intoxicated individuals. The control samples were also collected three years after the accident. For each individual, the three sample matrices, (blood, hair and urine) were collected in the same day. Urine samples were collected in polypropylene tubes and stored at -20°C until analysis. The hair was cut using stainless steel scissors at the scalp level in the occipital area and stored immediately in two plastic (PE-LD) zip-lock bags. Hair samples longer than 10 cm were cut into two sections to obtain samples of 3-5 cm from the root. Before analysis, hair samples were thoroughly cut into small pieces with scissors to facilitate homogenization and digestion. Blood samples were extracted by qualified personal, introduced in BD Vacutainer® Tubes (K2-EDTA) and stored at -20°C until analysis.

2.2. Quantification of the samples by triple spike isotope dilution analysis.

The samples were weighed in 10 mL microwave glass vessel. A different sample amount was weighed for each matrix: 0.10 g of hair, 0.15 g of blood or 0.50 g of urine. Immediately, all the samples were spiked with a known amount of ²⁰¹Hg-enriched MeHg, ¹⁹⁸Hg-enriched EtHg and ¹⁹⁹Hg-enriched Hg(II). The use of three labelled analogues, each one enriched in a different Hg isotope, allows the correction of species interconversions during the analytical procedure. More details on instrumentation, sample preparation procedure and calculation of concentrations are given in a previous work (Queipo-Abad *et al.*, 2017) and in the Supplementary material. All calculations and statistical analyses were carried out using Microsoft Excel spreadsheet software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Quality control of the measurements

In each measurement session we analyzed certified reference materials for quality control purposes and procedural blanks to assess possible contamination sources. Level 3 of the Standard Reference Material 955c (Caprine Blood) obtained from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA) was analyzed for quality control in blood samples. The certified reference material IAEA-086 (Human hair), from the International Atomic Energy Agency (IAEA, Vienna, Austria), was analyzed for quality control of human hair samples. Due to the lack of certified reference materials for urine, ³²³ the quality control of urine samples was carried out with the analysis of fortified samples. Table S.1 of the Supplementary material shows that the average results from all analytical sessions obtained for the Level 3 of NIST 955c and for IAEA 086 were in agreement with the certified values.

We have carried out an additional validation with the comparison of total Hg levels in blood with those provided by the Laboratory of Medicine of the Central University Hospital of Asturias (HUCA). Five blood samples from exposed individuals were analyzed in both laboratories. More details on the accredited procedure applied by the HUCA are given in the Supplementary material. Table S.1 shows that the sum of the concentrations obtained in the samples by our speciation methodology (THg = Hg(II) + MeHg + EtHg) were in general agreement with the THg values provided by the HUCA particularly for high Hg levels. For lower total Hg levels, the results obtained by HUCA were slightly lower than our results probably due to poorer limits of detection in the HUCA procedure.

3.2. Hg species concentration in blood, hair and urine samples.

Hg species concentrations in blood, hair and urine of the 17 intoxicated workers were compared with those obtained in the control group. The control group consisted of 10 close relatives of 10 exposed individuals. The level of EtHg in all samples from both groups were below the limit of quantification of the method (0.26 ng Hg g⁻¹) (Queipo-Abad *et al.*, 2017). This result is consistent with the assumption that the only known source of EtHg is vaccines containing thimerosal as antibacterial preservative (Clarkson, 2002). Table 1 shows the individual MeHg and Hg(II) levels measured in the three matrices for the exposed individuals and the control group. The additional information of the individuals is summarized in Table S.2. The descriptive statistics for the concentration results classified using the information given in Table S.2 are shown in Table 2. The same descriptive statistics are used in Table S.3 to show the percentage of the different species in the samples.

3.2.1. Hg species concentration in blood

As can be observed in Table 2 we obtained similar geometric means of Hg(II) concentration in the blood samples of both groups (1.2 and 1.5 ng g⁻¹). However, the MeHg geometric mean of the exposed individuals (8.1 ng Hg g⁻¹) was significantly higher than that obtained in the control group (5.8 ng Hg g⁻¹). Indeed, the percentage of MeHg in blood of the exposed individuals ranges from 46 to 98 % (Table S.3). The only blood sample in which MeHg is not the major Hg species corresponds to the oldest person of the study (individual 24). Additionally, we obtained surprisingly high concentrations of MeHg in blood in five of the exposed individuals who reported low fish consumption (individuals 4, 5, 7 and 8) or even, no consumption at all (individual 14). Table 2 shows that median blood MeHg concentrations increase with fish consumption. However, the geometric mean of MeHg concentration in blood of all individuals (both control and exposed) consuming fish 3 or 4 times per week (6.7 ng Hg g⁻¹) is very similar to that obtained in non-fish consumers (6.3 ng Hg g⁻¹). For example, the MeHg concentration in blood of a non-occupationally exposed individual who eats fish everyday was 9.3 ng Hg g⁻¹, whereas, as observed in Table 1 and Table S.3, other individuals consuming fish 2 times per week presented similar levels (9.1 ng Hg g⁻¹). The highest MeHg concentration in blood (21.6 ng Hg g⁻¹) corresponded to an occupationally exposed individual who reported a lack of fish consumption since the accident. Taking into account the reported half-life of MeHg in blood (Díez, 2008; Jo *et al.*, 2015), such a high MeHg concentration may not be due to fish consumption. Previous works showed that certain foodstuffs different from fish also contain significant Hg levels (European Food Safety Authority, 2012), such as poultry (Cabañero *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2017). However, Tables 2 and S.4 do not show any clear correlation of MeHg concentration and MeHg percentage with poultry, beef or pork consumption.

3.2.2. Hg species concentration in urine

In the case of urine, there are several works (Clarkson, 2002; Nuttall, 2004) indicating that most of Hg in urine is present as Hg(II). Our results are in agreement with those previous studies as more than 90% of the Hg found in urine is in the form of Hg(II) (Table S.4). This value is also in agreement with previous data of Hg species concentrations in urine (Nuttall, 2004). The median concentration of Hg(II) in urine was 1.3 ng Hg g⁻¹ and the highest concentration was 5.8 ng Hg g⁻¹ for a non-exposed individual (Table 2). In many cases, the levels of MeHg in urine were practically negligible and below the limit of quantification of the method. The median concentrations of Hg(II) in urine increase with the weekly frequency of fish consumption. However, there was no clear correlation between the levels of Hg(II) in urine with any of the other information showed in Table S.3.

3.2.3. Hg species concentration in hair

Similar MeHg levels in hair were found for both groups as the average concentrations for exposed and control individuals were 1.5 and 1.6 µg Hg g⁻¹, respectively. The levels of Hg(II) were

slightly different between both groups (average concentrations of 0.3 and 0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ for exposed and control individuals, respectively). The obtained Hg(II) percentages were below 20% in most samples (except for individual 6, which was 53.3%) and consequently the MeHg percentages were above 80%. These results are in agreement with previous publications (Berglund *et al.*, 2005; George *et al.*, 2010). The general assumption that THg levels in hair are equivalent to MeHg concentrations is not valid for our set of samples. As expected, the median concentrations for MeHg of all individuals increased with fish consumption (Table 2) from 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ for non-fish consumers to 2.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ for individuals consuming fish 3 or more times per week. The concentration of hair MeHg obtained for the person who eats fish every day was also 2.0 $\mu\text{g g}^{-1}$. These levels can be influenced by the type of fish consumed but this factor could not be evaluated in our study. The sum of the MeHg and Hg(II) values in hair obtained in our work, are in agreement with the 95th percentile (4.4 $\mu\text{g g}^{-1}$) of THg obtained for Spanish women reported in the European human biomonitoring study DEMOCOPHES (European Commission, 2012).

3.3. Additional factors influencing Hg species concentrations in the samples

Table 2 shows that MeHg levels in blood and hair vary depending on the consumption of tobacco. Smokers have a lower MeHg concentration in blood (median of 4.3 ng Hg g^{-1}) than ex-smokers (median of 10.4 ng Hg g^{-1}) and non-smokers (median 9.6 ng Hg g^{-1}). The same observation can be applied to hair samples. However, ex-smokers have a higher blood Hg(II) concentration (median of 2.9 ng Hg g^{-1}) than smokers and non-smokers (median of 0.9 and 0.7 ng Hg g^{-1} respectively). Different studies reporting lower concentrations of MeHg in smokers than in non-smokers (Jain, 2017; Lye *et al.*, 2013). Jain attributed this observation to a possible interaction of some tobacco constituents with blood, which could favour the excretion or demethylation of MeHg. In addition, it has been reported that the consumption of alcohol may decrease Hg(II) levels in blood due to an inhibition of the activity of catalase by ethanol (Çoban *et al.*, 2008). In our study, the participants were not asked about alcohol consumption, but it could be a source of variability in Hg species concentrations.

Since we have observed a different proportion of Hg species in blood and urine in the oldest person of the study, an influence of age on the Hg species concentration cannot be ruled out. Other studies reported an increase of the MeHg concentration in blood with age (Mortensen *et al.*, 2014; Sirot *et al.*, 2008). However, we checked the correlation between the concentrations of the different mercury species with age but we did not find any significant correlation.

Individuals 5, 7, 26 and 27 reported to have dental amalgams with Hg. These amalgams have a composition of 50% metallic elemental Hg and other metals (Clarkson, 2002). Therefore, Hg(0) may be released from the amalgam and transformed into Hg(II) in blood (Halbach and Clarkson, 1978). We did not find a correlation between Hg(II) in blood and urine with the number of amalgams, but median Hg(II) concentration in urine of people reporting dental amalgams is higher than the median of people without dental fillings (1.7 versus 0.9 ng g^{-1}). Individual 27 from

the control group informed that her dental fillings were manipulated a few days before sample collection and her Hg(II) concentration in urine was the highest from both groups (5.8 ng g⁻¹). Several works have studied the decrease of Hg(II) concentration over time after removing a dental amalgam (Björkman *et al.*, 1997; Halbach *et al.*, 2008).

3.4. Correlation between MeHg in blood with MeHg in hair

The MeHg hair-to-blood ratio was established as 250 by the Joint FAO / WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) in 2004, based on the average value obtained from different studies (JECFA-Joint FAO/WHO Expert Committee on food Additives, 2004). This value was calculated to facilitate the estimation of MeHg concentration in blood from the measured MeHg concentration in hair, which is a less invasive biomonitor. In our study, we have evaluated the hair-to-blood ratio for MeHg in both groups of samples. Figure 1 shows the correlation obtained for both groups. The correlation coefficient obtained for the control group was $r^2 = 0.8130$ and that for the exposed individuals was $r^2 = 0.8163$. There is a clear difference in the slope of the linear regression between the two groups. In the case of the control group, a slope of 245 ± 42 equivalent to the reference value established by JECFA was obtained. However, the slope obtained for the group of exposed individuals was significantly lower (135 ± 17). The MeHg hair-to-blood ratios obtained for each individual is given in Figure S.1. As can be observed there are eight intoxicated workers with a MeHg hair-to-blood ratio under 200, indicating that the level of MeHg in blood is significantly higher than their expected level in hair in comparison with the control group and the JECFA reference value.

There are some publications reporting Hg hair-to-blood ratios (Berglund *et al.*, 2005; Budtz-Jørgensen *et al.*, 2004; Liberda *et al.*, 2014; Yaginuma-Sakurai *et al.*, 2012) between 200-370, but it should be mentioned that not all the studies were based on MeHg concentrations. Liberda and co-workers (2014) observed hair-to-blood ratios closer to 250 for fish consumers. This observation was also reported by Budtz-Jørgensen and co-workers (2004) for Faroese Children above 14 years old with a high fish consumption and a hair-to-blood ratio closed to 250 (median of 264). These results are in agreement with our data for the control group as their main Hg exposure is supposed to be fish consumption. According to this, when fish consumption is the main MeHg exposure, the ingested MeHg is excreted in hair resulting in a concentration ca. 250 times higher in hair than in blood.

It is interesting to note that individual 27 from the control group presented the highest MeHg hair-to-blood ratio in this study. As commented above, her dental amalgams were manipulated days before the collection of samples. This is consistent with other studies showing increased MeHg concentrations in hair (Sakamoto *et al.*, 2007) and blood (Aitio *et al.*, 1983) due to a recent exposition to Hg(0)v. Thus, a lower hair-to-blood ratio could indicate that part of MeHg present in blood is not coming directly from fish consumption but from other sources. The biomethylation of Hg(II) deposits in different tissues or the remobilization of MeHg stored in tissues may be an

explanation for these results for the intoxicated workers. Human in vivo methylation has never been proved to be responsible of a significant increase of MeHg levels in human biomonitors (Rodríguez Martín-Doimeadios *et al.*, 2017), but it is known that some bacterial activity in mouth, gut or intestinal tract could be able to methylate Hg in a low extent (Leistevuo *et al.*, 2001; Rowland *et al.*, 1977; Rowland, 1995). The high MeHg levels in people exposed to high doses of Hg(0)_v remains unclear.

3.5. Correlation of MeHg levels in hair between exposed and non-exposed relatives

Figure 2 shows the correlation between MeHg concentration in hair of the exposed individuals with MeHg concentration in hair of their relatives. A correlation coefficient of $r^2 = 0.9355$ was obtained, excluding an outlier corresponding to an exposed individual that lives in a different location than his relative (individuals 7 and 22). When comparing MeHg concentrations in blood (Figure S.2) no correlation was found between exposed and control individuals. The correlation shown in Figure 2 demonstrates the importance of lifestyle-related factors in the accumulation of MeHg in hair. The diet is the predominant source of MeHg incorporation into the body and therefore the main factor regulating MeHg accumulation in hair. The slope of the correlation (0.77 ± 0.08) indicates that non-exposed relatives have a higher concentration of MeHg in hair than exposed individuals probably due to their higher fish consumption levels (Table S.3). It is worth noting that MeHg concentrations in hair of three individuals having the lowest hair-to-blood ratios (individuals 1, 5, 8), correlate very well with their relatives.

3.6. Correlation between MeHg in hair and blood with Hg(II) in urine

Demethylation of MeHg in the organism has been widely reported^{316,317} although the nature of this process remains unknown. Measuring the isotopic signature of Hg in blood and hair, Sherman *et al.* (2013) demonstrated that 70% of Hg(II) in urine comes from MeHg demethylation in people with less than ten dental amalgams consuming fish regularly.

Measuring Hg species concentrations, we were able to study the correlation of MeHg concentration in hair with Hg(II) concentration in urine. Figure 3 show such correlation between the exposed individuals and the control group. No significant difference was obtained between the slope obtained for the exposed individuals (883 ± 150) and that obtained for the control group (731 ± 183). The correlation coefficients (r^2) were 0.7119 and 0.6950 for exposed and the control group, respectively. It must be taken into account that two outliers were found in these correlation, corresponding to the individuals with the highest Hg(II) levels in urine (individuals 9 and 27). As commented before, individual 27 suffered a possible recent exposure to Hg(0)_v derived from her dental amalgams, which, according to Sherman *et al.* (2013), could significantly modify the

correlation of Hg(II) in urine with MeHg demethylation. Also, Halbach *et al.* (2008) observed an increment in blood MeHg due to the removal of Hg dental fillings. However, in the case of individual 9, we could not find any reason explaining the different behaviour in comparison with the other individuals.

The correlation of MeHg in blood with Hg(II) in urine is not as clear as that for MeHg in hair with Hg(II) in urine. Figure S.3 of the Supplementary material shows that we could find a correlation (excluding individual 27) for the control group obtaining a correlation coefficient of $r^2=0.6646$ and a slope of 3.03 ± 0.81 . Some of the exposed individuals fit well in the correlation of non-exposed individuals, but those presenting the lowest MeHg hair-to-blood ratios (individuals 5, 7, 8, 11, 12, 14, 16) are out of this correlation. The ratios of blood MeHg-to-urine Hg(II) for these individuals are much higher than those obtained for the control group. This means that these individuals present a higher concentration of MeHg in blood than that expected from their Hg(II) concentration in urine. These results are in agreement with the possible remobilization of Hg stored in tissues to increase the concentration of MeHg in blood of the exposed group.

3.7. Summary of the correlation between Hg species concentrations

If we summarized all the correlations between species, we can conclude first that the excretion of Hg(II) in urine is correlated with MeHg concentration in hair (Figure 3), both for the control group and the exposed individuals. This evidence was first described by Sherman and co-workers (2013) by means of stable isotope analysis of Hg in hair and urine. Also, when comparing the concentrations of MeHg in hair we obtained a correlation between the exposed individuals and their relatives with a slope of 0.77 and a regression coefficient of 0.9355 (Figure 2). However, we found a significant difference between the exposed individuals and the control group, when comparing MeHg concentration in blood (Figure S.2). In contrast to the control group, most of the exposed individuals showed MeHg levels in blood higher than those expected according to their Hg(II) concentration in urine (Figure S.3) and their MeHg concentrations in hair (Figure 1).

All these observations suggest that for exposed individuals there is a different correlation of MeHg in blood with other factors. However, MeHg levels in hair for the exposed individuals follow the same correlations than the control group. The strong correlation between Hg in contaminated fish and Hg in human hair applying stable isotope analysis has been previously reported (Li *et al.*, 2014). Our results agree with the assumption that MeHg in hair seems to come mainly from the diet, both for the exposed individuals and for the control group.

The lower MeHg hair-to-blood ratios for the exposed individuals indicate that part of the MeHg in blood should come from another source. There are eight intoxicated workers with MeHg hair-to blood lower than 200 and MeHg blood-to-Hg(II) urine ratios higher than the average ratio for the control group. We postulate here that this excess of MeHg in blood may come from Hg stores in different tissues, such as kidney or liver, and that those internal stores are not reflected

in an increased MeHg in hair. Indeed, the high correlation of MeHg concentrations in hair between the exposed workers and their relatives suggests that the MeHg ingested by the diet follows the same pathway for both groups. We investigated the possibility of a high uptake of MeHg through diet in the days before sample collection that could be detected in blood but not detected in hair, but it was denied by the exposed individuals. Most of the exposed individuals have moderate fish consumption as they were advised after the intoxication to reduce and even avoid fish consumption altogether by medical prescription. Four of them do not consume any fish and the rest do it moderately. For example, among the non-fish consumers, individual 14 showed the highest MeHg levels in hair and blood, and a MeHg hair-to-blood ratio of 158.

These results are only consistent with the hypothesis that there are two different MeHg sources in blood. One would correspond to the MeHg ingested through the diet that follows a classical deposition process in hair and a further demethylation process to be excreted through urine as Hg(II). The other source must be the result of a metabolic pathway occurring when a high concentration of Hg is stored in the organism. This could explain the high levels of MeHg in people with a moderate consumption of fish or even non-fish consumers. There are several studies of people highly exposed to Hg(0)_v showing increased organic Hg levels in blood. One hypothesis for this evidence described two binding sites for Hg in the kidney with different affinity (Clarkson and Magos, 1966), which in the case of an excess of Hg(0)_v would cause a redistribution of MeHg. Ishihara *et al.* (1977) used this hypothesis to explain the increase of the organic Hg levels in blood but not in the hair of women exposed to Hg(0)_v. Suzuki and co-workers (1976) described a weaker interaction of MeHg with tissues than that of Hg(II). In addition, the presence of Hg(II) induces renal metallothionein biosynthesis and glutathione reduction as mechanisms to reduce Hg toxicity (Cherian and Clarkson, 1976; Halbach *et al.*, 2008). Halbach and co-workers (2008) explained this procedure as an intra-extra cellular exchange of Hg species mediated by GSH (Glutathione) with a preferential affinity by Hg(II) than MeHg. After Hg(II) detoxification, MeHg could occupy the positions of Hg(II), increasing its concentration in erythrocytes. The different intra and extra cellular mechanisms together with the equilibrium established by the different compartments may be responsible of a redistribution of Hg species in blood and these procedures could be influenced by a high exposition to Hg(0)_v.

3.8. Comparison with other studies on Hg in different populations.

Average Hg species concentrations obtained in this study do not differ significantly between the exposed individuals and the control group. There are established limits such as NOAEL (No-Observed-Adverse-Effect-Level), LOAEL (*Lowest-Observed-Adverse-Effect-Level*), HBM levels (Human Biomonitoring), BAT (*Biologischer Arbeitsstoff-Toleranzwert*) and, PWTI (Provisional Tolerable Weekly Intake) that regulate Hg intake by fish consumption and occupational exposure to Hg(0)_v. However, large differences between Hg levels of different populations have been

reported. We have compared the Hg species concentrations obtained in our study with THg levels in blood previously reported in the literature.

Although speciation methodologies for Hg are scarce in human biomonitoring studies, some of the studies reported MeHg concentrations in blood. Figure 4 shows the comparison of THg and MeHg levels in blood obtained from different works. As can be observed, most of the studies show an average concentration of THg or MeHg in blood below 5 ng (of Hg) g⁻¹. This concentration corresponds to the HBM-I level, which indicates the Hg body burden that does not present any risk to health established by the German Human Biomonitoring (HBM) commission (Apel *et al.*, 2017; World Health Organization & PNUMA, 2008). The studies reporting low THg levels in blood belong to different European countries (Berglund *et al.*, 2005; Björnberg *et al.*, 2005; Gibb *et al.*, 2011; Gundacker *et al.*, 2010; Lindberg *et al.*, 2004; Puklová *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2007; Rignell-Hydbom *et al.*, 2007; Vahter *et al.*, 2000) and large population studies of Canada and U.S. (CDC-US, 2017; Lye *et al.*, 2013; Mortensen *et al.*, 2014). These studies report that the higher values of THg or MeHg in blood correspond to fish or seafood consumers such as the French coastal population, fishermen and relatives in Finland (Airaksinen *et al.*, 2010; Sirot *et al.*, 2008) or Faroese children in which the diet is highly influenced by pilot whale meat (Budtz-Jørgensen *et al.*, 2004). Only three of the studies present concentrations in blood above 25 ng (of Hg) g⁻¹, which is the THg threshold value defined by BAT (*Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz-Wert*) as the maximum allowable concentration of a substance or its metabolites in body. The studies reporting higher concentrations explain Hg exposure by fish consumption (Carta *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2009) or by living or working in areas of artisanal gold mining activities (Dolbec *et al.*, 2000). Another study related to people who follow a high fish consumption behaviour in Sweden (Björnberg *et al.*, 2005) shows that the THg levels are much lower than those found in similar studies conducted in Spain. The same observation was also reflected in the DEMOCOPHES (European Commission, 2012) study in hair between Swedish and Spanish women.

The average concentration of the individuals in our study is comparable to the concentrations reported for people of the same region, with and without occupational exposure. In addition, there are three studies with concentrations of THg in blood in the same range (Baeuml *et al.*, 2011; Jo *et al.*, 2015; Yaginuma-Sakurai *et al.*, 2012). This data is consistent with our data between the intoxicated individuals and the control group. Surprisingly, people in this region have blood THg values comparable to individuals from contaminated regions due to artisanal gold mining (Baeuml *et al.*, 2011). THg levels in blood of shellfish consumers of the French coast (Sirot *et al.*, 2008) are also closed to the average value of THg in blood in our study. In the light of these studies, we want to highlight the importance of speciation analysis, which could, for example, differentiate between populations with a high consumption of contaminated fish, or with a high exposure to Hg(0)_v. Studies reporting concentrations of the different Hg species would provide more information about contamination sources than those based only on THg concentrations.

4. CONCLUSIONS

This is the first study using a triple spike IDMS methodology reporting the levels of different mercury compounds in the three most commonly used human biomonitors (blood, urine and hair). Only one previous study (Akagi *et al.*, 1995) also analyzed blood, urine and hair of the same individuals but determined only total mercury and methylmercury. Also, they did not employ any method to correct for species transformation. So, we present the first case study employing the most advanced analytical procedure for mercury to date. The Hg species concentrations found in this study are similar to those obtained in previous studies carried out in the same region and in different regions with people highly exposed to MeHg intake by fish consumption. The concentrations obtained in the exposed individuals were not significantly different from those obtained in the control group, except for MeHg in blood. High MeHg levels obtained in some intoxicated individuals were surprising as they avoid fish consumption since the accident. A different correlation between MeHg in hair and MeHg in blood was obtained for these individuals compared to the control group who showed a hair-to-blood ratio (245) consistent with the reported value for people exposed to Hg via fish consumption (250). We found a correlation of MeHg in hair between the exposed individuals and the control group reflecting that MeHg excretion in hair follows the same pathways in both groups and depends on lifestyle factors such as fish consumption. We obtained also a correlation of MeHg in hair with Hg(II) in urine. The individuals showing lower MeHg hair-to-blood ratios showed higher MeHg blood-to-urine Hg(II) ratios than the control group. These observations suggest that some of the workers exposed to Hg⁰ show an increased MeHg level in blood after three years of the accident and that they do not follow the same MeHg excretion mechanisms (deposition in hair and demethylation and excretion through urine). We find very difficult to explain why a person who does not eat fish present a MeHg concentration of 21.6 ng (of Hg) g⁻¹ in his blood. At this point we can only hypothesize on MeHg remobilization or biomethylation processes to explain those abnormal MeHg levels in blood. Hg species have not been studied in individuals exposed to toxic levels of Hg⁰ thus far so the available information on the Hg species distribution in humans is very limited.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) through Project 16-TQ2015-70366P is acknowledged. SQA also acknowledges MINECO for the provision of a predoctoral grant BES-2013-062959. This work has been performed within the scope of an EMRP Organisation Research Excellence Grant, awarded in accordance with the EURAMET process to complement the JRP "Traceability for mercury measurements" (ENV51 MeTra). The EMRP is jointly funded by the EMRP participating countries within EURAMET and the European Union.

REFERENCES

- Airaksinen, R., Turunen, A.W., Rantakokko, P., Männistö, S., Vartiainen, T., Verkasalo, P.K., 2010. Blood concentration of methylmercury in relation to food consumption. *Public Health Nutr.* 14, 480–489. <https://doi.org/10.1017/S1368980010001485>
- Aitio, A., Valkonen, S., Kivistö, H., Yrjänheikki, E., 1983. Effect of occupational mercury exposure on plasma lysosomal hydrolases. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 53, 139–147.
- Akagi, H., Malm, O., Branches, F.J.P., Kinjo, Y., Kashima, Y., Guimaraes, J.R.D., Oliveira, R.B., Haraguchi, K., Pfeiffer, W.C., Takizawa, Y., Kato, H., 1995. Human exposure to mercury due to goldmining in the Tabajos River basin, Amazon, Brazil: Speciation of mercury in human hair, blood and urine. *Water Air Soil Pollut* 80: 85–94.
- Apel, P., Angerer, J., Wilhelm, M., Kolossa-Gehring, M., 2017. New HBM values for emerging substances, inventory of reference and HBM values in force, and working principles of the German Human Biomonitoring Commission. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 220, 152–166. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.09.007>
- Baeuml, J., Bose O'Reilly, S., Matteucci Gothe, R., Lettmeier, B., Roeder, G., Drasch, G., Siebert, U., 2011. Human Biomonitoring Data from Mercury Exposed Miners in Six Artisanal Small-Scale Gold Mining Areas in Asia and Africa. *Minerals* 1, 122–143. <https://doi.org/10.3390/min1010122>
- Barregard, L., Horvat, M., Mazzolai, B., Sällsten, G., Gibicar, D., Fajon, V., diBona, S., Munthe, J., Wängberg, I., Haeger Eugensson, M., 2006. Urinary mercury in people living near point sources of mercury emissions. *Sci. Total Environ.* 368, 326–334. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.08.048>
- Berglund, M., Lind, B., Björnberg, K.A., Palm, B., Einarsson, Ö., Vahter, M., 2005. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* 4, 1–11. <https://doi.org/10.1186/Received>
- Björkman, L., Sandborgh-Englund, G., Ekstrand, J., 1997. Mercury in Saliva and Feces after Removal of Amalgam Fillings 1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144, 156–162. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/taap.1997.8128>
- Björnberg, K.A., Vahter, M., Grawé, K.P., Berglund, M., 2005. Methyl mercury exposure in Swedish women with high fish consumption. *Sci. Total Environ.* 341, 45–52. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.09.033>
- Bose-O'Reilly, S., Drasch, G., Beinhoff, C., Rodrigues-Filho, S., Roeder, G., Lettmeier, B., Maydl, A., Maydl, S., Siebert, U., 2010. Health assessment of artisanal gold miners in Indonesia. *Sci. Total Environ.* 408, 713–725. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.070>
- Budtz-Jørgensen, E., Grandjean, P., Jørgensen, P.J., Weihe, P., Keiding, N., 2004. Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages. *Environ. Res.* 95, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.11.001>
- Cabañero, A.I., Madrid, Y., Cámara, C., 2005. Effect of Animal Feed Enriched with Se and Clays on Hg Bioaccumulation in Chickens: In Vivo Experimental Study. *J. Agric. Food Chem.* 53, 2125–2132. <https://doi.org/10.1021/jf048267v>
- Carta, P., Flore, C., Alinovi, R., Ibbá, A., Tocco, M.G., Aru, G., Carta, R., Girei, E., Mutti, A., Lucchini, R., Randaccio, F.S., 2003. Sub-Clinical Neurobehavioral Abnormalities Associated with Low Level of Mercury Exposure through Fish Consumption. *Neurotoxicology* 24, 617–623. [https://doi.org/10.1016/S0161-813X\(03\)00080-9](https://doi.org/10.1016/S0161-813X(03)00080-9)
- CDC-US, 2017. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. U.S. Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention. <https://doi.org/www.cdc.gov/exposurereport/index.html>
- Cherian, M.G., Clarkson, T.W., 1976. Biochemical changes in rat kidney on exposure to elemental mercury vapor: Effect on biosynthesis of metallothionein. *Chem. Biol. Interact.* 12, 109–120. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(76\)90093-4](https://doi.org/10.1016/0009-2797(76)90093-4)
- Choi, A.L., Weihe, P., Budtz-Jørgensen, E., Jørgensen, P.J., Salonen, J.T., 2009. Methylmercury Exposure and Adverse Cardiovascular Effects in Faroese Whaling Men 117, 367–372. <https://doi.org/10.1289/ehp.11608>
- Clarkson, T.W., 2002. The Three Modern Faces of Mercury. *Environ. Health Perspect.* 110, 11–23. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s11>
- Clarkson, T.W., Magos, L., 1966. Studies on the binding of mercury in tissue homogenates. *Biochem. J.* 99, 62–70. <https://doi.org/10.1042/bj0990062>

- Çoban, T.A., Beydemir, S., Gülçin, I., Ekinci, D., 2008. The effect of ethanol on erythrocyte carbonic anhydrase isoenzymes activity : An in vitro and in vivo study. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 23, 266–270. <https://doi.org/10.1080/14756360701474780>
- Cross, J.D., Dale, I.M., Goolvard, L., Lenihan, J.M.A., Smith, H., 1978. Methyl mercury in blood of dentists. *Lancet* 312, 312–313. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(78\)91711-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(78)91711-7)
- Díez, S., 2008. Human Health Effects of Methylmercury Exposure, in: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. pp. 111–132. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09647-6_3
- Dock, L., Rissanen, R.-L., Vahter, M., 1994. Demethylation and placental transfer of methyl mercury in the pregnant hamster. *Toxicology* 94, 131–142. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0300-483X(94)90033-7)
- Dolbec, J., Mergler, D., Soussa-Passos, C.J., Soussa de Morais, S., Lebel J., 2000. Methylmercury exposure affects motor performance of a riverine population of the Tapajós river, Brazilian Amazon. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 73, 195–203. <https://doi.org/10.1007/s004200050027>
- Drasch, G., Böse-O'Reilly, S., Beinhoff, C., Roider, G., Maydl, S., 2001. The Mt. Diwata study on the Philippines 1999 - assessing mercury intoxication of the population by small scale gold mining 267, 151–168. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00806-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00806-8)
- European Commission, 2012. DEMOCOPHES Human biomonitoring on a European scale. <https://doi.org/http://www.eu-hbm.info/democophes/>
- European Food Safety Authority, 2012. Scientific Opinion on the risk for public health related to the presence of mercury and methylmercury in food, *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2985>.
- Fitzgerald, W.F., Lamborg, C.H., Hammerschmidt, C.R., 2007. Marine Biogeochemical Cycling of Mercury. *Chem. Rev.* 107, 641–662. <https://doi.org/10.1021/cr050353m>
- George, G.N., Singh, S.P., Myers, G.J., Watson, G.J., Pickering, I.J., 2010. The Chemical Forms of Mercury in Human Hair: A Study using X-ray Absorption Spectroscopy. *J Biol Inorg Chem.* 15, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0638-x>.The
- Gibb, H., Haver, C., Kozlov, K., Centeno, J.A., Jurgenson, V., Kolker, A., Conko, K.M., Landa, E.R., Xu, H., 2011. Biomarkers of Mercury Exposure in Two Eastern Ukraine Cities. *J. Occup. Environ. Hyg.* 8, 187–193. <https://doi.org/10.1080/15459624.2011.556984>
- Gundacker, C., Fröhlich, S., Graf-Rohrmeister, K., Eibenberger, B., Jessenig, V., Gicic, D., Prinz, S., Wittmann, K.J., Zeisler, H., Vallant, B., Pollak, A., Husslein, P., 2010. Perinatal lead and mercury exposure in Austria. *Sci. Total Environ.* 408, 5744–5749. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.07.079>
- Halbach, S., Clarkson, T.W., 1978. Enzymatic oxidation of mercury vapor by erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 523, 522–531. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(78\)90055-4](https://doi.org/10.1016/0005-2744(78)90055-4)
- Halbach, S., Vogt, S., Köhler, W., Felgenhauer, N., Welzl, G., Kremers, L., Zilker, T., Melchart, D., 2008. Blood and urine mercury levels in adult amalgam patients of a randomized controlled trial: Interaction of Hg species in erythrocytes. *Environ. Res.* 107, 69–78. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.07.005>
- Ishihara, N., Urushiyama, K., Suzuki, T., 1977. Inorganic and Organic Mercury in Blood , Urine and Hair in Low Level Mercury Vapour Exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 40, 249–253. <https://doi.org/10.1007/BF00381412>
- Jain, R.B., 2017. Trends in and factors affecting the observed levels of urinary inorganic and total blood mercury among US children, adolescents, adults, and senior citizens over 2005-2012. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 56, 268–281. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.09.003>
- JECFA-Joint FAO/WHO Expert Committee on food Additives, 2004. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. 61th report, WHO Technical Report Series 922; WHO: Geneva. <https://doi.org/www.who.int/foodsafety/publications/jecfa-reports/en/>
- Jo, S., Woo, H.D., Kwon, H.-J., Oh, S.-Y., Park, J.-D., Hong, Y.-S., Pyo, H., Park, K.S., Ha, M., Kim, H., Sohn, S.-J., Kim, Y.-M., Lim, J.-A., Lee, S.-A., Eom, S.-Y., Kim, B.-G., Lee, K.-M., Lee, J.-H., Hwang, M.S., Kim, J., 2015. Estimation of the Biological Half-Life of Methylmercury Using a Population Toxicokinetic Model. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 9054–9067. <https://doi.org/10.3390/ijerph120809054>
- Korpiel, J.A., Vidic, R.D., 1997. Effect of Sulfur Impregnation Method on Activated Carbon Uptake of Gas-Phase Mercury. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2319–2325. <https://doi.org/10.1021/es9609260>
-

- Laffont, L., Maurice, L., Amouroux, D., Navarro, P., Monperrus, M., Sonke, J.E., Behra, P., 2012. Mercury speciation analysis in human hair by species-specific isotope-dilution using GC-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 3001–10. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6116-2>
- Laffont, L., Sonke, J.E., Maurice, L., Monrroy, S.L., Chincheros, J., Amouroux, D., Behra, P., 2011. Hg speciation and stable isotope signatures in human hair as a tracer for dietary and occupational exposure to mercury. *Environ. Sci. Technol.* 45, 9910–9916. <https://doi.org/10.1021/es202353m>
- Leistevuo, J., Leistevuo, T., Helenius, H., Pyy, L., Österblad, M., Huovinen, P., Tenovuoto, J., 2001. Dental Amalgam Fillings and the Amount of Organic Mercury in Human Saliva. *Caries Res.* 35, 163–166. <https://doi.org/10.1159/000047450>
- Li, M., Sherman, L.S., Blum, J.D., Grandjean, P., Mikkelsen, B., Weihe, P., Sunderland, E.M., Shine, J.P., 2014. Assessing Sources of Human Methylmercury Exposure Using Stable Mercury Isotopes. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8800–8806. <https://doi.org/10.1021/es500340r>
- Liberda, E.N., Tsuji, L.J.S., Martin, I.D., Ayotte, P., Dewailly, E., Nieboer, E., 2014. The complexity of hair/blood mercury concentration ratios and its implications. *Environ. Res.* 134, 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.08.007>
- Lindberg, A., Björnberg, K.A., Vahter, M., Berglund, M., 2004. Exposure to methylmercury in non-fish-eating people in Sweden. *Environ. Res.* 96, 28–33. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.09.005>
- Lye, E., Legrand, M., Clarke, J., Probert, A., 2013. Blood Total Mercury Concentrations in the Canadian Population: Canadian Health Measures Survey Cycle 1, 2007-2009. *Quant. Res.* 104, 246–251. <https://doi.org/10.17269/cjph.104.3772>
- Mason, R.P., Reinfelder, J.R., Morel, F.M.M., 1995. Bioaccumulation of mercury and methylmercury. *Water, Air, Soil Pollut.* 80, 915–921. <https://doi.org/10.1007/BF01189744>
- Mortensen, M.E., Caudill, S.P., Caldwell, K.L., Ward, C.D., Jones, R.L., 2014. Total and methyl mercury in whole blood measured for the first time in the U.S. population: NHANES 2011 – 2012. *Environ. Res.* 134, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.07.019>
- Nuttall, K.L., 2004. Review : Interpreting Mercury in Blood and Urine of Individual Patients. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 34, 235–250. <https://doi.org/10.0091-7370/04/0300-0235>
- Puklová, V., Krsková, A., Cerná, M., Cejchanová, M., Rehurková, I., Ruprich, J., Kratzer, K., Kubínová, R., Zimová, M., 2010. The mercury burden of the Czech population : An integrated approach. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213, 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2010.02.002>
- Queipo-Abad, S., Rodríguez-González, P., Davis, W.C., García Alonso, J.I., 2017. Development of a Common Procedure for the Determination of Methylmercury, Ethylmercury, and Inorganic Mercury in Human Whole Blood, Hair, and Urine by Triple Spike Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 89, 6731–6739. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00966>
- Queipo-Abad, S., Rodríguez-González, P., García Alonso, J.I., 2016. Evidence of the direct adsorption of mercury in human hair during occupational exposure to mercury vapour. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 36, 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.03.012>
- Reis, M.F., Sampaio, C., Brantes, A., Aniceto, P., Melim, M., Cardoso, L., Gabriel, C., Simao, F., Pereira-Miguel, J., 2007. Human exposure to heavy metals in the vicinity of Portuguese solid waste incinerators – Part 3: Biomonitoring of Pb in blood of children under the age of 6 years. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210, 455–459. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.01.021>
- Rignell-Hydbom, A., Axmon, A., Lundh, T., Jönsson, B.A., Tiido, T., Spano, M., 2007. Dietary exposure to methyl mercury and PCB and the associations with semen parameters among Swedish fishermen. *Environ. Heal.* 6, 14. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-6-14>
- Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Mateo, R., Jiménez-Moreno, M., 2017. Is gastrointestinal microbiota relevant for endogenous mercury methylation in terrestrial animals? *Environ. Res.* 152, 454–461. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.06.018>
- Rowland, I., Davies, M., Grasso, P., 1977. Biosynthesis of Methylmercury Compounds by the Intestinal Flora of the Rat. *Arch. Environ. Health* 32, 24–28. <https://doi.org/10.1080/00039896.1977.10667248>
- Rowland, I.R., 1995. The interaction of the gut flora with metal compounds, in: *Role of Gut Bacteria in Human Toxicology and Pharmacology.* p. 300.
- Sakamoto, M., Feng, X., Li, P., Qiu, G., Jiang, H., Yoshida, M., Iwata, T., Liu, X.-J., Murata, K., 2007. High Exposure of Chinese Mercury Mine Workers to Elemental Mercury Vapor and Increased Methylmercury Levels in Their Hair. *Environ. Health Prev. Med.* 12, 66–70. <https://doi.org/10.1007/BF02839815>

- Selin, N.E., 2009. Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 34, 43–63. <https://doi.org/10.1146/annurev.envIRON.051308.084314>
- Sherman, L.S., Blum, J.D., Franzblau, A., Basu, N., 2013. New Insight into Biomarkers of Human Mercury Exposure Using Naturally Occurring Mercury Stable Isotopes. *Environ. Sci. Technol.* 47, 3403–3409. <https://doi.org/10.1021/es305250z>
- Sirof, V., Guérin, T., Mauras, Y., Garraud, H., Volatier, J.-L., Leblanc, J.-C., 2008. Methylmercury exposure assessment using dietary and biomarker data among frequent seafood consumers in France CALIPSO study. *Environ. Res.* 107, 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.12.005>
- Suda, I., Hirayama, K., 1992. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by hydroxyl radical produced from rat liver microsomes. *Arch. Toxicol.* 66, 398–402. <https://doi.org/10.1007/BF02035129>
- Suzuki, T., Hongo, T., Yoshinaga, J., Imai, H., Nakazawa, M., Matsuo, N., Akagi, H., 1993. The Hair-Organ Relationship in Mercury Concentration in Contemporary Japanese. *Arch. Environ. Health* 48, 221–229. <https://doi.org/10.1080/00039896.1993.9940363>
- Suzuki, T., Shishido, S., Ishihara, N., 1976. Interaction of Inorganic to Organic Mercury in Their Metabolism in Human Body. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 38, 103–113. <https://doi.org/10.1007/BF00378620>
- Takeuchi, T., Morikawa, N., Matsumoto, H., Shiraishi, Y., 1962. A Pathological Study of Minamata Disease in Japan. *Acta Neuropathol.* 2, 40–57. <https://doi.org/10.1007/BF00685743>
- Tsuji, J.S., Williams, P.R.D., Edwards, M.R., Allamneni, K.P., Kelsh, M. a., Paustenbach, D.J., Sheehan, P.J., 2003. Evaluation of mercury in urine as an indicator of exposure to low levels of mercury vapor. *Environ. Health Perspect.* 111, 623–630. <https://doi.org/10.1289/ehp.5717>
- Vahter, M., Akesson, A., Lind, B., Björs, U., Schütz, A., Berglund, M., 2000. Longitudinal study of methylmercury and inorganic mercury in blood and urine of pregnant and lactating women, as well as in umbilical cord blood. *Environ. Res.* 84, 186–94. <https://doi.org/10.1006/enrs.2000.4098>
- Wilhelm, M., Müller, F., Idel, H., 1996. Biological monitoring of mercury vapour exposure by scalp hair analysis in comparison to blood and urine. *Toxicol. Lett.* 88, 221–226. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(96\)03741-1](https://doi.org/10.1016/0378-4274(96)03741-1)
- World Health Organization, 2015. Human biomonitoring: facts and figures. <https://doi.org/http://www.euro.who.int/en/media-centre/events/events/2015/04/ehp-mid-term-review/publications/human-biomonitoring-facts-and-figures>
- World Health Organization & PNUMA, 2008. GUIDANCE FOR IDENTIFYING POPULATIONS AT RISK FROM MERCURY EXPOSURE. <https://doi.org/www.who.int/foodsafety/publications/risk-mercury-exposure/en/>
- Yaginuma-Sakurai, K., Murata, K., Iwai-Shimada, M., Nakai, K., Kurokawa, N., Tatsuta, N., Satoh, H., 2012. Hair-to-blood ratio and biological half-life of mercury : experimental study of methylmercury exposure through fish consumption in humans. *J. Toxicol. Sci.* 37, 123–130. <https://doi.org/10.2131/jts.37.123>
- Yin, R., Zhang, W., Sun, G., Feng, Z., Hurley, J.P., Yang, L., Shang, L., Feng, X., 2017. Mercury risk in poultry in the Wanshan Mercury Mine, China. *Environ. Pollut.* 230, 810–816. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.027>

FIGURES

Figure 1. MeHg concentration in hair samples (ng Hg g⁻¹) versus MeHg concentration in blood samples (ng Hg g⁻¹) of the exposed individuals and the control group.

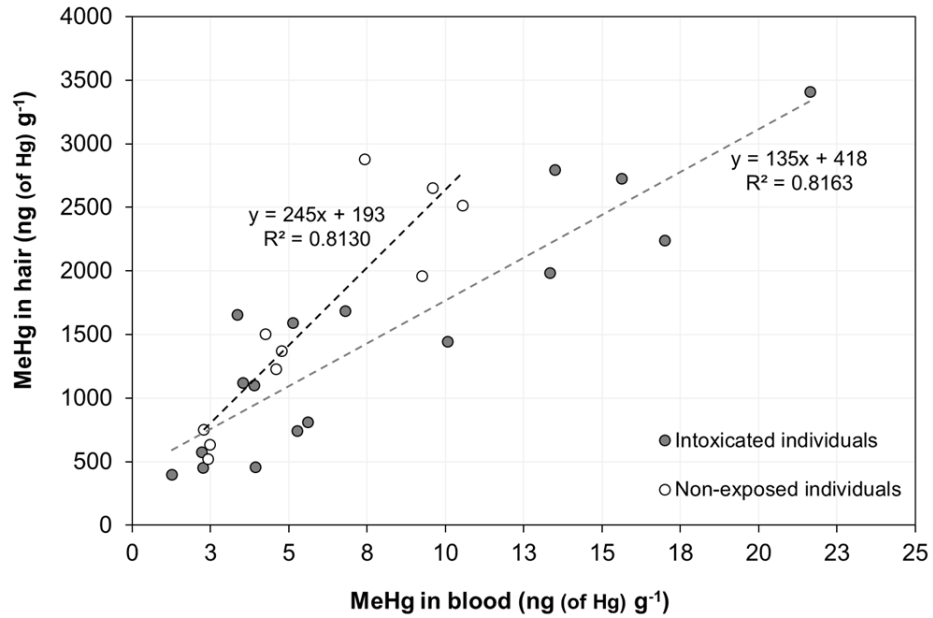


Figure 2. MeHg concentrations in hair samples of exposed individuals (µg Hg g⁻¹) versus MeHg concentration in hair samples of their corresponding relatives (µg Hg g⁻¹). The numbers in brackets indicate the identification of the exposed individual and his relative.

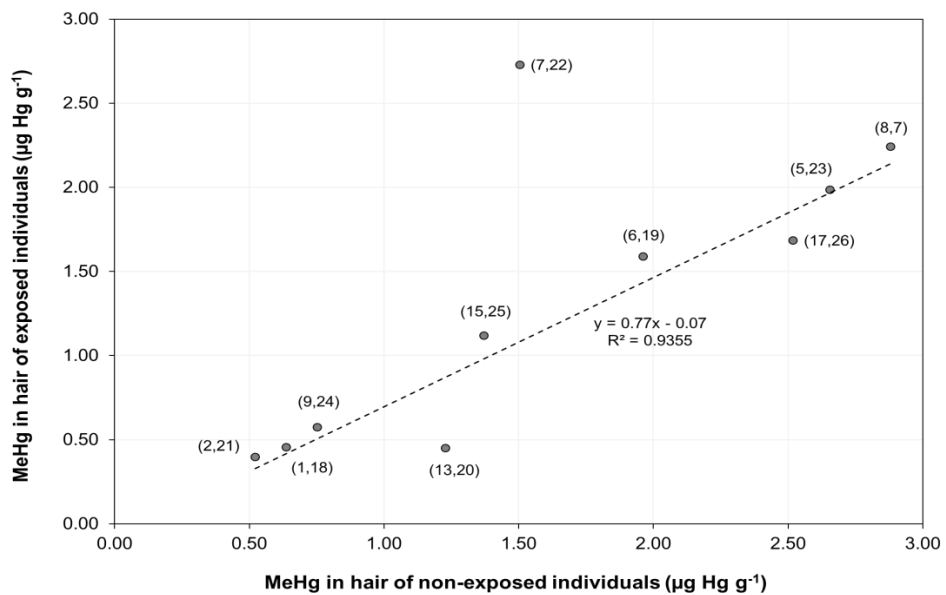


Figure 3. MeHg concentrations in hair samples (ng Hg g^{-1}) versus Hg(II) concentrations in urine samples (ng Hg g^{-1}) of exposed and non-exposed individuals.

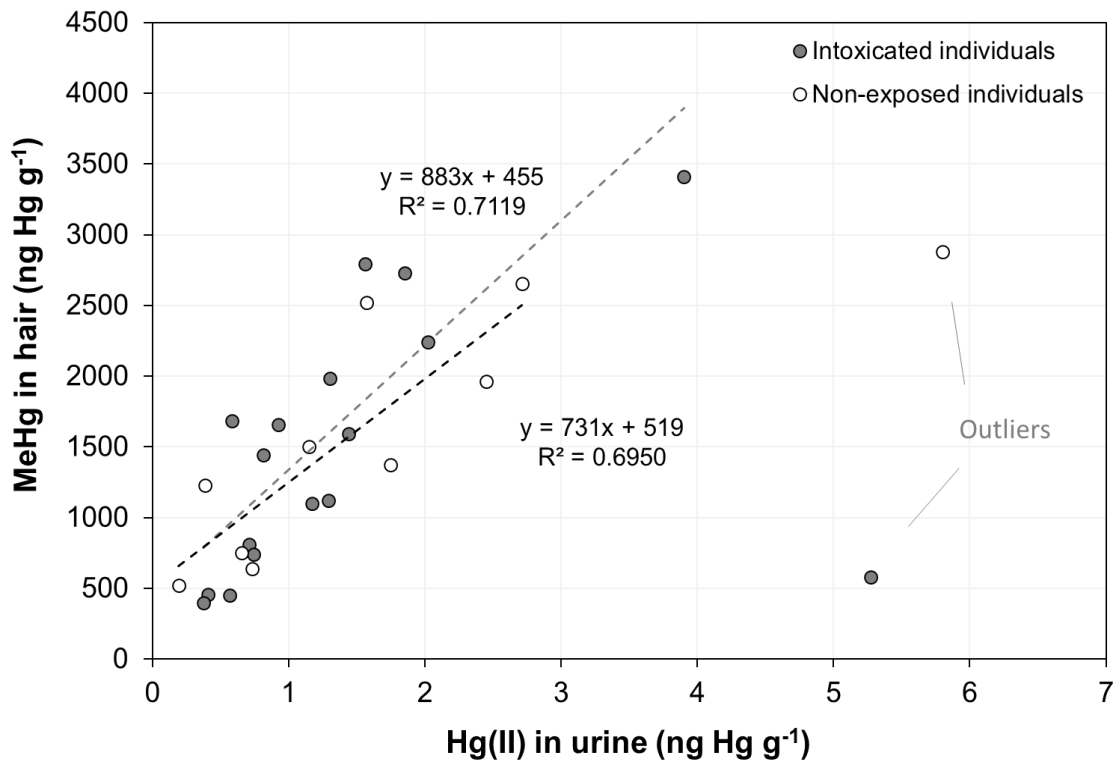
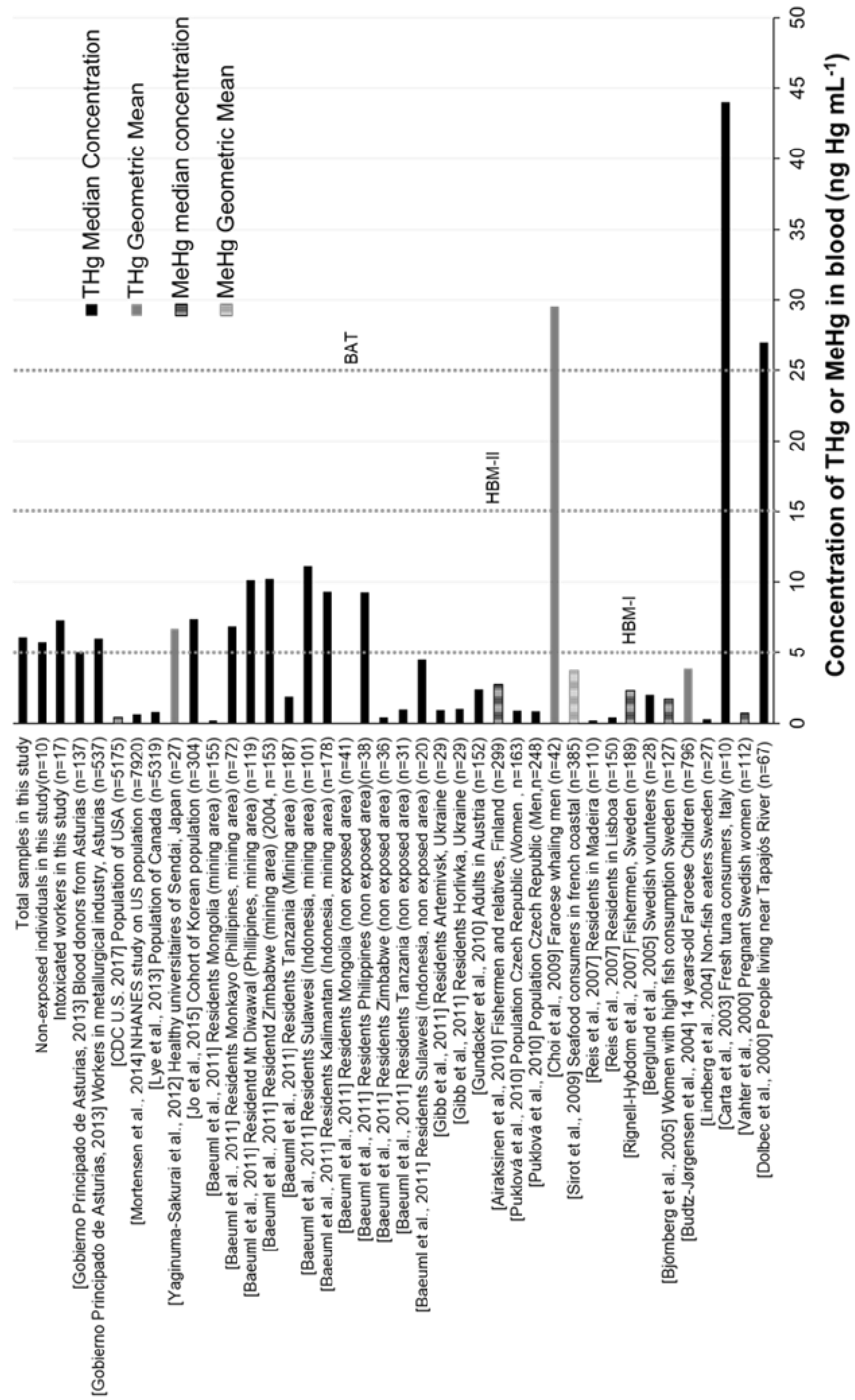


Figure 4. Comparison of THg and MeHg concentrations in blood obtained in this work with those obtained in other studies (ng mL⁻¹). The vertical dot-lines represent the threshold values (HBM-I, HBM-II, BAT) for risk assessment on mercury concentrations.



1

TABLES

2 **Table 1.** Individual concentrations of Hg(II) and MeHg obtained in urine, blood and hair of the
3 exposed individuals and the control group.

	Sample	Urine (ng Hg g ⁻¹)		Blood (ng Hg g ⁻¹)		Hair (µg Hg g ⁻¹)	
		Hg(II)	MeHg	Hg(II)	MeHg	Hg(II)	MeHg
Exposed Individuals	1	0.41	0.01	0.67	3.94	0.04	0.46
	2	0.37	0.00	0.29	1.25	0.05	0.40
	3	1.17	0.01	0.67	3.88	0.07	1.10
	4	1.56	0.01	0.71	13.48	0.31	2.80
	5	1.30	0.05	4.12	13.33	0.13	1.99
	6	1.44	0.04	0.97	5.11	1.84	1.59
	7	1.85	0.08	0.35	15.62	0.27	2.73
	8	2.02	0.05	0.31	16.99	0.23	2.24
	9	5.28	0.20	1.61	2.22	0.13	0.58
	10	0.92	0.06	1.82	3.34	0.10	1.66
	11	0.71	0.05	1.80	5.60	0.06	0.81
	12	0.74	0.04	3.61	5.26	0.08	0.74
	13	0.57	0.04	0.47	2.25	0.10	0.45
	14	3.90	0.11	0.84	21.64	0.24	3.41
	15	1.29	0.05	1.17	3.53	0.09	1.12
	16	0.82	0.06	0.54	10.06	0.12	1.44
	17	0.58	0.06	0.49	6.80	0.29	1.69
Control Group	18	0.73	0.03	0.94	2.48	0.03	0.64
	19	2.45	0.06	0.82	9.26	0.40	1.96
	20	0.39	0.02	1.51	4.58	0.09	1.23
	21	0.19	0.02	0.51	2.41	0.05	0.52
	22	1.15	0.06	0.74	4.24	0.09	1.50
	23	2.71	0.09	0.81	9.59	0.16	2.65
	24	0.66	0.08	2.61	2.28	0.11	0.75
	25	1.75	0.06	0.67	4.76	0.09	1.37
	26	1.57	0.06	4.26	10.55	0.15	2.52
	27	5.80	0.11	2.20	7.42	0.11	2.88

4

Table 2 . Descriptive statistics (geometric means (GM), medians (50th percentile), 95th percentiles and minimum (Min) and maximum (Max) values) for MeHg and Hg(II) concentrations in blood, hair and urine for all the individuals divided into classified groups.

	MeHg in blood (ng (of Hg) g ⁻¹)			Hg(II) in blood (ng (of Hg) g ⁻¹)			MeHg in hair (µg (of Hg) g ⁻¹)			Hg(II) in hair (µg (of Hg) g ⁻¹)			MeHg in urine (ng (of Hg) g ⁻¹)			Hg(II) in urine (ng (of Hg) g ⁻¹)			
	N	GM	50th-95th Percentile	Min-Max	GM	50th-95th Percentile	Min-Max	GM	50th-95th Percentile	Min-Max	GM	50th-95th Percentile	Min-Max	GM	50th-95th Percentile	Min-Max	GM	50th-95th Percentile	Min-Max
Total of individuals	27	7.1 ± 5.4	5.1-16.7	1.3-21.6	1.3 ± 1.2	0.8-4.0	0.3-4.3	1.5 ± 0.9	1.4-2.9	0.4-3.4	0.2 ± 0.4	0.1-0.4	0.0-0.2	1.6 ± 1.5	1.3-5.0	0.2-5.8			
Men (exposed workers)	17	8.1 ± 6.4	5.3-18.4	1.3-21.6	1.2 ± 1.2	0.7-3.8	0.3-4.1	1.5 ± 1.0	1.1-3.0	0.4-3.4	0.3 ± 0.4	0.1-0.8	0.0-0.1	1.5 ± 1.4	1.3-4.3	0.4-5.3			
Women (control group)	10	5.8 ± 3.2	4.7-10.1	2.3-10.5	1.5 ± 1.2	0.9-3.5	0.5-4.3	1.6 ± 0.9	1.4-2.8	0.5-2.9	0.1 ± 0.1	0.1-0.3	0.0-0.1	1.7 ± 1.7	1.4-4.4	0.2-5.8			
Smokers	12	4.3 ± 2.2	4.3-7.9	1.3-9.3	1.0 ± 0.5	0.9-1.7	0.3-1.8	1.0 ± 0.5	1.0-1.8	0.4-2.0	0.3 ± 0.5	0.1-1.0	0.0-0.1	1.3 ± 1.4	0.7-3.7	0.4-5.3			
Ex-Smokers	4	10.8 ± 5.4	10.4-16.4	5.3-17.0	2.6 ± 1.7	2.9-4.0	0.3-4.1	2.0 ± 0.9	2.1-2.8	0.7-2.9	0.1 ± 0.1	0.1-0.2	0.0-0.1	2.5 ± 2.3	1.7-5.2	0.7-5.8			
Non-Smokers	9	9.3 ± 6.7	9.6-19.2	2.3-21.6	1.3 ± 1.3	0.7-3.6	0.3-4.3	2.0 ± 1.0	2.5-3.2	0.5-3.4	0.2 ± 0.1	0.1-0.3	0.0-0.1	1.6 ± 1.1	1.6-3.4	0.2-3.9			
Fish consumption	5	6.3 ± 8.6	2.5-18.1	1.3-21.6	0.6 ± 0.3	0.7-0.9	0.3-0.9	1.1 ± 1.3	0.5-2.9	0.4-3.4	0.1 ± 0.1	0.0-0.2	0.0-0.0	1.2 ± 1.5	0.6-3.3	0.4-3.9			
No consumption	4	4.0 ± 1.3	4.2-5.2	2.3-5.3	2.1 ± 1.3	2.1-3.5	0.7-3.6	1.0 ± 0.2	0.9-1.2	0.7-1.2	0.1 ± 0.0	0.1-0.1	0.0-0.1	0.7 ± 0.3	0.7-1.1	0.4-1.2			
1 time per week	9	9.1 ± 5.8	6.8-16.4	2.2-17.0	1.2 ± 1.2	1.0-3.7	0.3-4.1	1.7 ± 0.9	1.7-2.8	0.5-2.8	0.4 ± 0.6	0.2-1.2	0.0-0.2	1.7 ± 1.5	1.4-4.0	0.2-5.3			
2 times per week	6	6.7 ± 2.9	6.1-10.3	3.5-10.5	1.6 ± 1.4	1.7-3.2	0.7-4.3	2.0 ± 0.8	2.0-2.8	1.1-2.9	0.1 ± 0.1	0.1-0.2	0.0-0.1	2.4 ± 1.8	1.7-5.0	1.2-5.8			
3-4 times per week	1	9.3	9.3	9.3	0.8	0.8	0.8	2.0	2.0	2.0	0.4	0.4	0.1	2.4	2.4	2.4			
Poultry consumption	4	8.5 ± 5.3	7.2-14.7	3.9-15.6	0.7 ± 0.3	0.7-0.9	0.3-1.0	1.7 ± 0.9	1.8-2.6	0.5-2.7	0.6 ± 0.8	0.3-1.6	0.0-0.0	1.5 ± 0.9	1.6-2.4	0.4-2.4			
No consumption	3	3.7 ± 1.3	4.2-4.5	2.2-4.6	0.9 ± 0.5	0.7-1.4	0.5-1.5	1.1 ± 0.5	1.2-1.5	0.5-1.5	0.1 ± 0.0	0.1-0.1	0.0-0.1	0.7 ± 0.4	0.6-1.1	0.4-1.2			
1 time per week	17	7.7 ± 5.8	5.6-17.9	1.3-21.6	1.6 ± 1.3	0.8-4.1	0.3-4.3	1.6 ± 1.0	1.4-3.0	0.4-3.4	0.1 ± 0.1	0.1-0.3	0.0-0.1	1.9 ± 1.7	1.3-5.4	0.2-5.8			
2 times per week	1	2.5	2.5	2.5	0.9	0.9	0.9	0.6	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.7	0.7	0.7			
> 2 times per week	1	2.5	2.5	2.5	0.9	0.9	0.9	0.6	0.6	0.6	0.0	0.0	0.0	0.7	0.7	0.7			
Beef consumption	8	7.7 ± 5.3	6.5-15.7	2.2-17.0	1.8 ± 1.2	1.7-3.6	0.3-4.1	1.7 ± 0.9	1.7-2.8	0.6-2.9	0.1 ± 0.0	0.1-0.2	0.0-0.1	2.5 ± 2.0	1.7-5.6	0.7-5.8			
1 time per week	17	6.9 ± 5.6	4.8-16.8	1.3-21.6	1.1 ± 1.1	0.7-3.7	0.3-4.3	1.5 ± 0.9	1.2-2.9	0.4-3.4	0.2 ± 0.4	0.1-0.7	0.0-0.1	1.2 ± 0.9	1.2-2.7	0.2-3.9			
2 times per week	1	9.3	9.3	9.3	0.8	0.8	0.8	2.0	2.0	2.0	0.4	0.4	0.1	2.4	2.4	2.4			
Pork consumption	6	5.5 ± 2.9	4.6-9.6	2.5-10.5	1.8 ± 1.7	0.8-4.1	0.5-4.3	1.2 ± 0.8	0.9-2.3	0.5-2.5	0.1 ± 0.1	0.1-0.3	0.0-0.1	0.9 ± 0.4	0.7-1.5	0.4-1.6			
No consumption	17	7.8 ± 6.2	5.1-17.9	1.3-21.6	1.2 ± 1.0	0.8-2.9	0.3-4.1	1.6 ± 1.0	1.5-3.0	0.4-3.4	0.2 ± 0.4	0.1-0.6	0.0-0.1	1.9 ± 1.7	1.4-5.4	0.2-5.8			
1 time per week	1	3.5	3.5	3.5	1.2	1.2	1.2	1.1	1.1	1.1	0.1	0.1	0.0	1.3	1.3	1.3			
2 times per week	1	3.5	3.5	3.5	1.2	1.2	1.2	1.1	1.1	1.1	0.1	0.1	0.0	1.3	1.3	1.3			
Age	4	4.5 ± 0.9	4.5-5.5	3.5-5.6	1.1 ± 0.5	1.0-1.7	0.7-1.8	1.2 ± 0.3	1.2-1.5	0.8-1.5	0.1 ± 0.0	0.1-0.1	0.0-0.1	1.2 ± 0.4	1.2-1.7	0.7-1.7			
30-39 yr	11	9.2 ± 6.5	9.6-18.6	1.3-21.6	1.3 ± 1.5	0.7-4.2	0.3-4.3	1.9 ± 1.1	2.0-3.1	0.4-3.4	0.2 ± 0.1	0.1-0.3	0.0-0.1	1.9 ± 1.6	1.6-4.6	0.2-5.3			
40-49 yr	8	6.5 ± 4.9	4.8-14.3	2.2-17.0	1.0 ± 0.6	0.9-2.0	0.3-2.2	1.4 ± 0.9	1.4-2.7	0.5-2.9	0.4 ± 0.6	0.1-1.3	0.0-0.1	1.7 ± 1.8	1.1-4.6	0.4-5.8			
50-59 yr	2	3.8 ± 2.1	3.8-5.1	2.3-5.3	3.1 ± 0.7	3.1-3.6	2.6-3.6	0.7 ± 0.0	0.7-0.8	0.7-0.8	0.1 ± 0.0	0.1-0.1	0.0-0.1	0.7 ± 0.1	0.7-0.7	0.7-0.7			
≥ 60 yr	4	11.7 ± 3.5	11.9-15.3	7.4-15.6	2.7 ± 1.8	3.2-4.2	0.3-4.3	2.5 ± 0.4	2.6-2.9	2.0-2.9	0.2 ± 0.1	0.1-0.3	0.0-0.1	2.6 ± 2.1	1.7-5.2	1.3-5.8			
Dental amalgams	21	6.3 ± 5.1	4.6-16.6	1.3-21.6	1.1 ± 0.8	0.8-2.5	0.3-3.6	1.3 ± 0.9	1.1-2.8	0.4-3.4	0.2 ± 0.4	0.1-0.4	0.0-0.1	1.4 ± 1.2	0.9-3.8	0.2-5.3			
Yes	4	11.7 ± 3.5	11.9-15.3	7.4-15.6	2.7 ± 1.8	3.2-4.2	0.3-4.3	2.5 ± 0.4	2.6-2.9	2.0-2.9	0.2 ± 0.1	0.1-0.3	0.0-0.1	2.6 ± 2.1	1.7-5.2	1.3-5.8			
No	17	6.3 ± 5.1	4.6-16.6	1.3-21.6	1.1 ± 0.8	0.8-2.5	0.3-3.6	1.3 ± 0.9	1.1-2.8	0.4-3.4	0.2 ± 0.4	0.1-0.4	0.0-0.1	1.4 ± 1.2	0.9-3.8	0.2-5.3			

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Concentration of mercury species in hair, blood and urine of individuals occupationally exposed to gaseous elemental mercury in Asturias (Spain) and its comparison with individuals from a control group formed by close relatives.

Silvia Queipo Abad¹, Pablo Rodríguez González*¹, Eduardo Martínez-Morillo², W. Clay Davis³, José Ignacio García Alonso¹

¹ *Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006, Oviedo (Spain)*

² *Service of Clinical Biochemistry, Laboratory of Medicine, Central University Hospital of Asturias (HUCA), 33011, Oviedo (Spain)*

³ *Chemical Sciences Division, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, Maryland 20899, USA.*

* Author for correspondence: rodriguezpablo@uniovi.es

Procedure of sample preparation

After spiking, a volume of 3 mL of 25% TMAH was added and we performed the focused assisted microwave extraction of the samples. Once digested, we added 3 mL of acetic acid/sodium acetate buffer (pH 4) and we adjust the pH to 4 with HCl 10%. A derivatization step is required in order to perform the species separation by Gas Chromatography. We added 0.6 mL of a 2% w/v sodium (tetra-n-propyl)borate in Milli-Q water and 1 ml of hexane for liquid-liquid extraction, followed by 5 min of manual shaking. The extract was centrifuged (5000 rpm for 5 min), and the organic layer was cleaned up using homemade Florisil® columns before its preconcentration into a N₂ stream. The samples were pre-concentrated until a final volume of approximately 10 µL. The same procedure was performed for Standard Reference Materials of caprine Blood and human hair.

Measurement of the isotope ratios

The measurement of the isotopic ratios in the isotope dilution mixture was performed by ICP-MS in the Time Resolved Analysis mode (TRA), with previous separation of the species by the GC system. The measured isotopes of Hg were 198, 199, 200, 201 and 202, with a selected integration time per isotope of 80 ms. The isotope ratios were always computed as peak area ratios by the integration with the commercial software supplied with the ICP-MS instrument. Mass bias correction was performed using an internal correction based on the minimization described in a previous publication (Queipo-Abad *et al.*, 2017). The calculation of the concentration of the three mercury compounds was then carried out by isotope pattern deconvolution. The general equations for triple spike isotope dilution were developed and published elsewhere. The application of Isotope Pattern Deconvolution (IPD) provides the molar fractions by expressing the isotope abundances of the isotope diluted sample as a function of the Hg natural isotope abundances and the isotope abundances of the isotopically enriched tracers. This procedure assumes that the isotopic composition in a mixture of a natural abundance and a labeled compound is a linear combination of the isotope patterns of the different constituents of the mixture.

Procedure of sample preparation for THg in blood (HUCA laboratory)

The procedure of sample preparation is employed for the determination of toxic metals in blood. Whole blood samples were collected in BD Vacutainer® Tubes (K2-EDTA). The samples were diluted (1:20) with an ammoniacal solution to solubilize the Hg and extracting it from the matrix of blood. The ammoniacal solution consists of 0.5 g of Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 500 µL of Triton X-100, 40 mL of 1-butanol (High Purity), 10 mL of ammonia, and the solution is diluted to 1 L with Milli-Q water. This ammoniacal solution also contains the internal standard for quantification by calibration (²⁰⁹Bi). The diluted samples are prepared for analysis by

ICP-MS (Agilent 7700x). The measurements are performed for the isotope ^{201}Hg with an integration time of 3s. Measurements are performed in triplicate for each sample.

Table S.1. Results obtained in the analysis of SRM 955c (caprine blood) IAEA-086 (human hair) and comparison of the total Hg values obtained in five human blood samples between the laboratory of the University of Oviedo and the Laboratory Medicine of the Central University Hospital of Asturias.

Quality control material	N	ng (of Hg) g ⁻¹	Hg(II)	MeHg	EtHg	THg
NIST SRM 955c - Level 3 (Caprine Blood)	4	Experimental	8.77 ± 0.93	4.81 ± 0.37	4.28 ± 0.67	17.85 ± 0.90
		Certified	8.55 ± 1.23	4.27 ± 0.95	4.81 ± 0.45	16.91 ± 1.52
IAEA-086 (Human hair with endogenous Hg)	3	Experimental	264 ± 8	278 ± 3	4.00 ± 0.00	546 ± 9
		Certified	-	258 ± 22	-	573 ± 39
Blank	5		0.27 ± 0.12	0.07 ± 0.13	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.18
H3 - blood	2	Lab UNIOVI [§]	0.89 ± 0.17	3.70 ± 0.18	0.01 ± 0.00	4.59 ± 0.25
	3	HUCA*	-	-	-	3,09 ± 0.06
H7 - blood	2	Lab UNIOVI	1.33 ± 0.59	12.17 ± 0.01	0.02 ± 0.01	13.52 ± 0.59
	3	HUCA	-	-	-	12,95 ± 0.31
H8 - blood	2	Lab UNIOVI	1.07 ± 0.01	19.62 ± 0.21	0.02 ± 0.01	20.71 ± 0.21
	3	HUCA	-	-	-	18,07 ± 0.33
H9 - blood	2	Lab UNIOVI	1.66 ± 0.13	3.94 ± 0.10	0.01 ± 0.00	5.61 ± 0.16
	3	HUCA	-	-	-	5,12 ± 0.02
H13 - blood	2	Lab UNIOVI	0.87 ± 0.06	1.94 ± 0.01	0.00 ± 0.01	2.82 ± 0.06
	3	HUCA	-	-	-	1,78 ± 0.05

[§] Laboratory from the University of Oviedo (UNIOVI)

* Laboratory of Medicine, Central University Hospital of Asturias (HUCA)

Table S.2. Characteristics and lifestyle habits of the exposed and non-exposed individuals in this study.

	No. Sample	Gender	Age	Consumption* of:				Smoker	Dental amalgams	
				Fish	Poultry	Beef	Pork			
Occupationally Exposed Individuals to Hg_v⁰ (Men)	1	Male	54	No	No	B	A	Yes	0	
	2	Male	44	No	B	B	B	Yes	0	
	3	Male	40	A	B	B	A	No	0	
	4	Male	47	B	B	B	B	No	0	
	5	Male	45	B	B	A	B	Ex-smoker	4	
	6	Male	50	B	No	B	B	Yes	0	
	7	Male	40	B	No	B	B	No	1	
	8	Male	53	B	B	A	B	Ex-smoker	0	
	9	Male	48	B	B	A	B	Yes	0	
	10	Male	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	Male	31	B	B	A	B	Yes	0	
	12	Male	62	A	B	B	A	Ex-smoker	0	
	13	Male	50	No	A	B	B	Yes	0	
	14	Male	45	No	B	B	B	No	0	
	15	Male	31	C	B	B	C	Yes	0	
	16	Male	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	Male	40	B	B	B	A	Yes	0	
Non-Occupationally Exposed Individuals (Women)	18	Female	54	No	C	B	A	Yes	0	
	19	Female	54	D	No	B	No	Yes	0	
	20	Female	51	A	A	B	B	Yes	0	
	21	Female	48	B	B	B	B	No	0	
	22	Female	36	C	A	A	B	No	0	
	23	Female	41	C	B	A	B	No	0	
	24	Female	70	A	B	A	B	No	0	
	25	Female	30	C	B	B	B	Yes	0	
	26	Female	46	C	B	B	A	No	2	
	27	Female	51	C	B	A	B	Ex-smoker	3	

*Frequency of consumption per week: No: Not consumption; A: 1 time; B: 2 times; C: 3-4 times; D: Everyday

Figure S.1. Hair-to-blood ratios of MeHg for the exposed and non-exposed individuals.

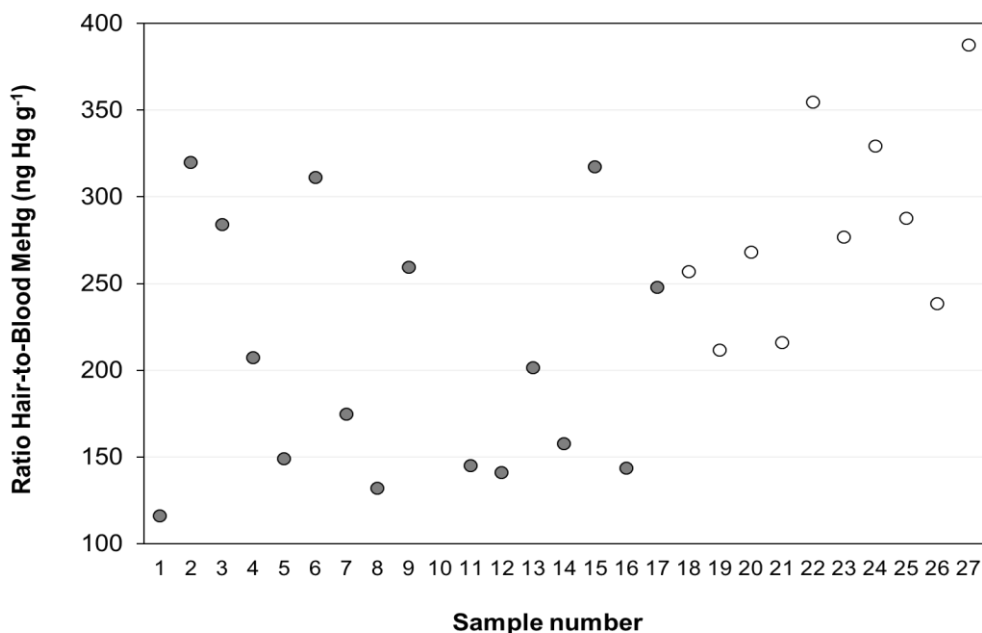


Figure S.2. MeHg concentrations in blood of the exposed individuals versus the concentration found in their relatives. A trend line corresponding to slope 1 and intercept 0 is also represented the numbers in brackets indicate the identification of the exposed individual and his relative.

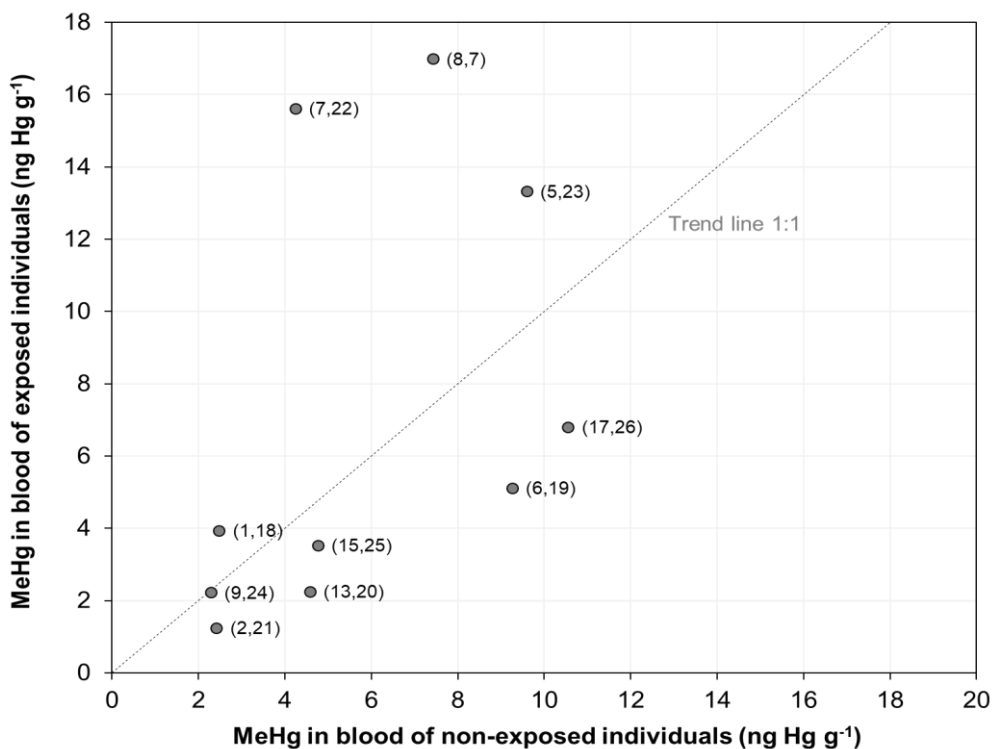
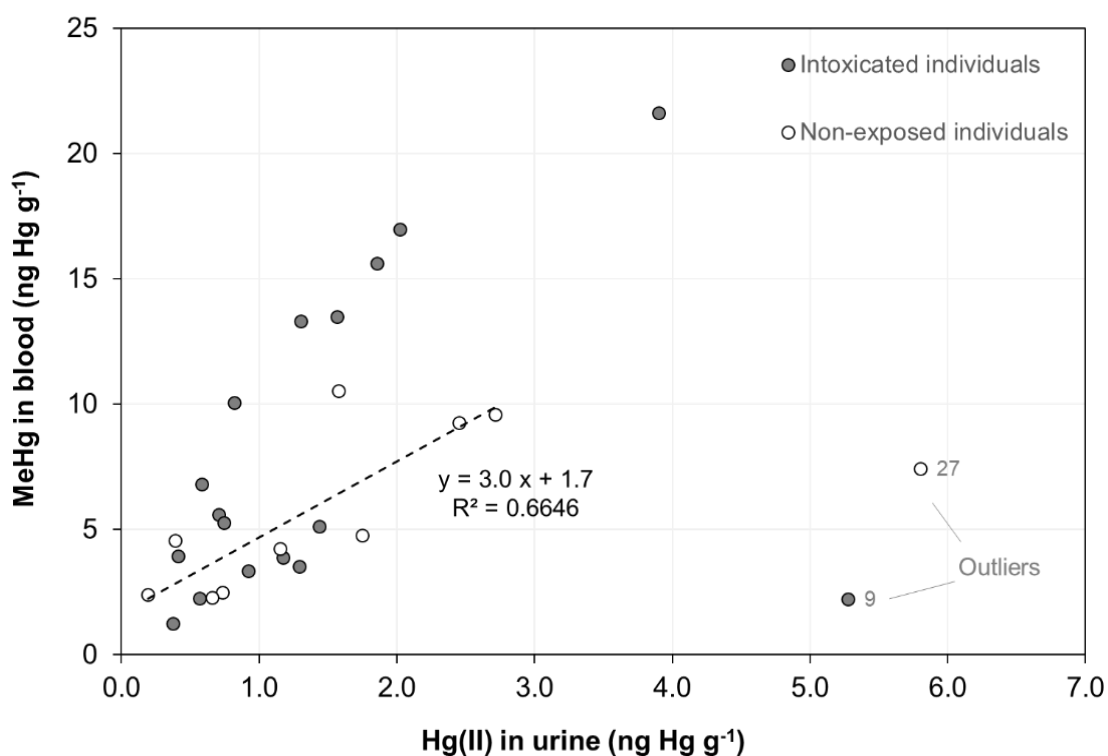


Figure S.3. Diagram of dispersion for blood MeHg to urine Hg(II) concentrations. The trend line corresponds to the control group of non-exposed individuals, except for the marked outlier.



References

Queipo Abad, S.; Rodríguez-González, P.; Davis, W. C.; García Alonso, J. I., 2017 Development of a common procedure for the determination of methylmercury, ethylmercury, and inorganic mercury in human whole blood, hair, and urine by triple spike species-specific isotope dilution mass spectrometry. *Anal. Chem.* 89, 6731- 6739.

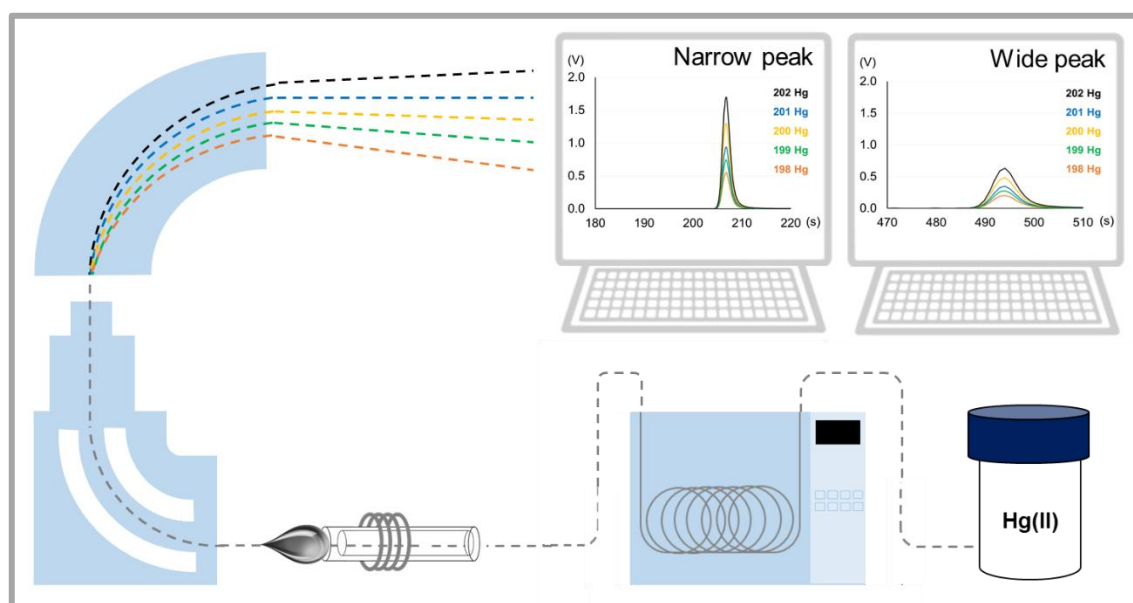
D.3. Desarrollo de una metodología para la medida precisa y exacta de relaciones isotópicas específicas del compuesto en muestras biológicas

Artículo científico V:

Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2019, 34, 753–763

Measurement of Compound-Specific Hg isotopic composition in narrow transient signals by Gas Chromatography coupled to Multicollector ICP-MS

Silvia Queipo-Abad, Pablo Rodríguez-González, José Ignacio García Alonso



D.3.1. Introducción

Las variaciones isotópicas naturales en los isótopos estables de mercurio han sido objeto de estudio en las dos últimas décadas. El mercurio no solo tiene interés debido a su alta toxicidad y riesgo para la salud, sino también por la posibilidad de emplearlo como trazador de diferentes transformaciones biogeoquímicas en el medio ambiente y los organismos.^{324,325} Cuando una transformación bio-geoquímica tiene lugar de forma incompleta a nivel isotópico, se observa el fraccionamiento de sus isótopos. La mayoría de los elementos experimentan fraccionamiento dependiente de la masa (MDF), en el cual las transformaciones se producen prioritariamente para los isótopos más ligeros.²²⁴ Además algunos elementos, entre los que se incluye el Hg, pueden dar lugar a fraccionamiento independiente de la masa (MIF).²³² Este tipo de fraccionamiento está relacionado con otros factores como el espín nuclear de los isótopos (efecto magnético de los isótopos, MIE)^{229,326} o la estructura del núcleo (efecto de volumen nuclear, NVE).^{228,231} La magnitud del fraccionamiento isotópico puede relacionarse con el tipo de reacción a través de la cual se ha transformado el Hg, y es dependiente de la especie química en que se encuentre. La composición isotópica total del mercurio es el resultado de las composiciones isotópicas individuales de las especies. Por lo tanto, la medida de la composición total no refleja resultados fiables. Esto significa que en muestras biológicas, el análisis de composiciones isotópicas individuales sería de gran interés para entender el ciclo biogeoquímico del Hg, su reactividad, movilidad y bioacumulación.

El desarrollo del análisis de isótopos estables específicos del compuesto (CSIA) requiere el acoplamiento de técnicas cromatográficas a instrumentos de tipo multicolector para medir composiciones isotópicas de las especies de Hg. Este análisis puede conducir a nuevos conocimientos sobre el comportamiento biogeoquímico de las especies de mercurio en el medio ambiente. La mayoría de los estudios realizados hasta ahora sobre el fraccionamiento isotópico de Hg se centran en la composición isotópica de Hg total,^{237,238,327} y solo unas pocas publicaciones han medido las composiciones isotópicas específicas de especies de Hg.^{181,273,328,329} Esto se debe principalmente a las dificultades encontradas en la medida de relaciones isotópicas en señales transientes y a la baja concentración de especies de Hg en muestras reales.³³⁰ Se han propuesto procedimientos exhaustivos de preparación de muestras

que incluyen pasos de preconcentración,³³¹ o protocolos alternativos para la extracción selectiva de MeHg.³³² En 2001, Krupp *et al.*, presentaron la primera metodología híbrida para la medida de relaciones isotópicas específicas de compuestos orgánicos de Pb.¹⁵⁶ Esta metodología alcanzó precisiones de 0.008 a 0.2% de RSD. Desde entonces, se han llevado a cabo varios estudios con el objetivo de mejorar la medida de las relaciones isotópicas específicas de la especie. En 2008, Epov *et al.*,¹⁸¹ publicaron un estudio para la evaluación de la misma metodología híbrida, en la medida de relaciones isotópicas relativas de especies de Hg en señales transientes. La reproducibilidad externa para este método fue de un 0,56 ‰ expresada como 2SD, que se aproxima a los valores obtenidos deltas de Hg por generación de vapor frío (CVG). En su caso, también se evaluaron diferentes parámetros en el cálculo de las relaciones isotópicas, como la selección del porcentaje de pico.

Una de las estrategias utilizadas para mejorar la precisión es la extensión del pico cromatográfico aumentando la anchura de los picos cromatográficos. Con esto se pretende tener más puntos de medida de las relaciones isotópicas sobre el pico cromatográfico. En este campo, una de las mejoras más importantes se basó en el cálculo de las relaciones isotópicas a través de la pendiente de la regresión lineal entre los dos isótopos.¹⁵⁷ Este método se aplicó a la especiación de Hg obteniendo las mejores precisiones con respecto a la CVG hasta la fecha. (0.2-0.5 ‰ como 2SD de reproducibilidad externa).¹⁵⁸ Uno de los desafíos de estas técnicas ha sido la identificación del desfase temporal en la medida de relaciones isotópicas durante la elución del pico. Inicialmente, se atribuyó a un fraccionamiento en la columna cromatográfica,¹⁵⁶ pero estudios posteriores revelaron que tenía un origen instrumental.^{159,282,333,334} Una investigación más exhaustiva concluyó que la causa del desfase temporal era la resistencias de los amplificadores de las copas de Faraday, que no permiten seguir los cambios bruscos de intensidad que se dan en las señales transientes.¹⁶⁰ Después de este descubrimiento, se desarrollaron varios métodos para corregir este desfase temporal en las intensidades obtenidas, aplicándola a la señal transiente en LA-MC-ICP-MS y en GC-MC-ICP-MS para Pb, respectivamente.^{161,162}

En este trabajo se presenta una evaluación de los principales parámetros que afectan la precisión y la exactitud de la medición de las proporciones de isótopos específicos del compuesto de Hg por GC-MC-ICP-MS: ancho de pico cromatográfico, tiempo de integración, número de puntos de adquisición, estrategia de tratamiento de datos y corrección de la deriva de la relación de isótopos durante el pico de elución. La evaluación de los diferentes parámetros se realizó mediante mediciones delta cero con Hg(II) - NIST 3133. La precisión y la exactitud de la metodología se determinaron para el estándar secundario NIST RM-8610, que es el nuevo estándar UM-Almaden desarrollado por NIST. Estas mediciones se realizaron en un protocolo de medida conocido como estándar-muestra-estándar utilizando Hg(II) -NIST 3133 como el estándar de referencia.

D.3.2. Objetivos

El objetivo de este Objetivo es el desarrollo de una metodología para la medida exacta y precisa de relaciones isotópicas del Hg en señales transientes. Este objetivo principal se ha desarrollado a partir de los siguientes puntos:

3.1. Optimización de los parámetros experimentales para el acoplamiento de la cromatografía de gases al sistema multicolector ICP-MS.

3.2. Evaluación de la precisión obtenida mediante la medida de relaciones isotópicas de Hg(II) en el NIST 3133 vs. NIST 3133

3.3. Evaluación de la exactitud obtenida mediante la medida de relaciones isotópicas de Hg(II) en el NIST RM 8610 vs. NIST 3133

3.4 Optimización de los parámetros óptimos para el cálculo de relaciones isotópicas (anchura de pico, número de puntos, método de cálculo)



Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2019, **34**, 753

Measurement of compound-specific Hg isotopic composition in narrow transient signals by gas chromatography coupled to multicollector ICP-MS†

Silvia Queipo-Abad, Pablo Rodríguez-González * and José Ignacio García Alonso

The study of the natural variations of Hg isotopic composition is a valuable tool to understand the Hg biogeochemical cycle. Hg mobility, toxicity and bioaccumulation depends on its chemical form, so compound-specific Hg isotope ratio measurements, by coupling chromatographic techniques to multicollector ICP-MS, provide an extra degree of information in comparison to total Hg isotope ratio measurements. We present in this work a thorough evaluation of the main parameters affecting the accuracy and precision of Hg compound-specific isotope ratio measurements by Gas chromatography (GC) coupled to MC-ICPMS. The main parameters evaluated in this work were the chromatographic peak width, integration time, number of acquisition points and data treatment strategy. A new method for the correction of the time lag between Faraday cups, responsible for isotope ratio drift during peak elution, is proposed and evaluated under different experimental conditions. A standard-sample-standard bracketing approach was applied to calculate the delta values from the mass bias corrected Hg(II)-specific isotope ratios, using NIST-3133 as the delta zero standard. The optimized conditions were obtained when working with regular GC peaks (2–5 s at the peak base), 0.131 s as integration time, 321–641 acquisition points and calculating the isotope ratios using the slope of the linear regression obtained when plotting two isotopic signals. The accuracy and precision of the optimized methodology were determined with the analysis of the secondary standard NIST RM-8610 (UM-Almaden) versus the delta zero standard NIST-3133. When injecting 2 μL of a Hg(II) solution of 250 ng g^{-1} Hg(II)-specific delta values in agreement with the reference values were obtained with an external reproducibility (expressed as 2SD) of 0.34–0.40‰. Our results demonstrate that the measurement of Hg isotope ratios in narrow GC peaks provides the same level of accuracy and external reproducibility of Hg compound specific delta values in comparison with previously published approaches based on wide GC peaks, therefore offering shorter analysis times and higher chromatographic resolution than those previously obtained with wide chromatographic peaks.

Received 26th December 2018
Accepted 19th February 2019

DOI: 10.1039/c8ja00453f

rscli/jaas

1. Introduction

Mercury is a global pollutant released into the atmosphere by natural and anthropogenic processes,¹ and occurs in different chemical forms and/or oxidation states in terrestrial, atmospheric and aquatic ecosystems.² On one hand, the determination of the different Hg species in a sample (speciation analysis) can be extremely helpful to understand the Hg biogeochemical cycle as Hg reactivity, mobility and bioaccumulation depend on its chemical form. On the other hand, the accurate and precise measurement of Hg isotopic

composition in environmental samples is a valuable tool to understand the Hg pathway in the environment and to fingerprint contamination sources.^{3,4} Hg has seven stable isotopes that can undergo mass-dependent and/or mass-independent fractionation (MDF and MIF, respectively) during different bio-geochemical processes. MIF of Hg isotopes has been related to two mechanisms: the magnetic isotope effect and the nuclear volume effect (also known as the nuclear field shift effect),^{5–9} MIF of Hg isotopes is preserved in many transformations and can be related to the provenance of mercury.¹⁰

The coupling of chromatographic techniques to multicollector ICP-MS to measure compound-specific Hg isotopic compositions may lead to new insights into the biogeochemical behavior of mercury species in the environment. Most of the studies carried out thus far on the fractionation of Hg isotopes are focused on total Hg isotope signatures^{11–13} and only a few

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006 – Oviedo, Spain. E-mail: rodriguezpablo@uniovi.es

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c8ja00453f

Measurement of Compound-Specific Hg isotopic composition in narrow transient signals by Gas Chromatography coupled to Multicollector ICP-MS

Silvia Queipo-Abad, Pablo Rodríguez-González*, José Ignacio García Alonso

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

*Author for correspondence: rodriguezpablo@uniovi.es

ABSTRACT

The study of the natural variations of Hg isotopic composition is a valuable tool to understand Hg biogeochemical cycle. Hg mobility, toxicity and bioaccumulation depends on its chemical form, so compound-specific Hg isotope ratio measurements, by coupling chromatographic techniques to multicollector instruments, provide an extra degree of information in comparison to total Hg isotope ratio measurements. We present in this work a thorough evaluation of the main parameters affecting the accuracy and precision of Hg compound-specific isotope ratio measurements by Gas chromatography (GC) coupled to MC-ICP-MS. The main parameters evaluated in this work were the chromatographic peak width, integration time, number of acquisition points and data treatment strategy. A new method for the correction of the time lag between Faraday cups, responsible of isotope ratio drift during peak elution, is proposed and evaluated under different experimental conditions. A standard-sample-standard bracketing approach was applied to calculate the delta values from the mass bias corrected Hg(II)-specific isotope ratios, using NIST-3133 as delta zero standard. The optimized conditions were obtained when working with regular GC peaks (2-5 s at the peak base), 0.131 s as integration time, 321-641 acquisition points and calculating the isotope ratios using the slope of the linear regression obtained when plotting two isotopic signals. The accuracy and precision of the optimized methodology were determined with the analysis of the secondary standard NIST RM-8610 (UM-Almaden) versus the delta zero standard NIST-3133. When injecting 2 μL of a Hg(II) solution of 250 ng g^{-1} and Hg(II)-specific delta values in agreement with the reference values were obtained with an external reproducibility (expressed as 2SD) of 0.34 -0.40 ‰. Our results demonstrate that the measurement of Hg isotope ratios in narrow GC peaks provides the same level of accuracy and external reproducibility of Hg compound specific delta values in comparison with previously published approaches based on wide GC peaks. Therefore, offering lower analysis

times and higher chromatographic resolution than those previously obtained with wide chromatographic peaks.

1. INTRODUCTION

Mercury is a global pollutant released to the atmosphere by natural and anthropogenic processes,¹ and occurs in different chemical forms and/or oxidation states in terrestrial, atmospheric and aquatic ecosystems.² On one hand, the determination of the different Hg species in a sample (speciation analysis) can be extremely helpful to understand Hg biogeochemical cycle as Hg reactivity, mobility and bioaccumulation depend on its chemical form. On the other hand, the accurate and precise measurement of Hg isotopic composition in environmental samples is a valuable tool to understand Hg pathway in the environment and to fingerprint contamination sources.^{3,4} Hg has seven stable isotopes that can undergo mass-dependent and/or mass-independent fractionation (MDF and MIF, respectively) during different bio-geochemical processes. MIF of Hg isotopes have been related to two mechanisms: the magnetic isotope effect and the nuclear volume effect (also known as nuclear field shift effect),⁵⁻⁹ MIF of Hg isotopes is preserved in many transformations and can be related to the provenance of mercury.¹⁰

The coupling of chromatographic techniques to multicollector instruments to measure compound-specific Hg isotopic compositions may lead to new insights into the biogeochemical behavior of mercury species in the environment. Most of the studies carried out thus far on the fractionation of Hg isotopes are focused on total Hg isotope signatures¹¹⁻¹³ and only a few publications have measured Hg species-specific isotopic compositions.¹⁴⁻¹⁷ This is mainly due to the difficulties encountered in the measurement of isotope ratios in transient signals and the low concentration levels of Hg species in real samples.¹⁸ Exhaustive sample preparation procedures including preconcentration steps¹⁹ or alternative protocols for the selective extraction of MeHg have been proposed.²⁰

In 2001, Krupp and coworkers²¹ reported the first application on the hyphenation of a chromatographic technique to a MC-ICP-MS reporting precisions in lead isotope ratio measurements ranging from 0.008 to 0.2% of RSD for tetraethylated lead. In 2008, Epov¹⁴ and coworkers reported an external reproducibility of 0.56 ‰ for $\delta^{202}\text{Hg}$ as 2SD, obtained by GC-MC-ICP-MS. This approach was mainly based on a GC-adapted standard-sample-standard bracketing scheme and the widening of the chromatographic peak using isothermal temperature programs to increase the number of acquisition points during the chromatographic peak elution.

Concerning data treatment, the accuracy and precision of compound-specific isotope ratios was improved by calculating the isotopic ratios from the slope of a linear regression between isotopic signals. This strategy was initially developed by Fietzke *et al.*²² for transient signals obtained by Laser Ablation coupled to MC-ICP-MS and lately applied by Epov *et al.*²³ to measure

compound-specific isotope ratios of Hg by GC-MC-ICP-MS. The external reproducibility (2SD) obtained applying this strategy ranged between 0.2-0.5 ‰ for $\delta^{202}\text{Hg}$. Using this approach, the data treatment procedure is significantly simplified as the selection of a specific percentage of acquisition points within the chromatographic peak is avoided and the background correction is straightforward.

Isotope ratio drift during peak elution has been reported when hyphenating a chromatographic technique to MC-ICP-MS. Initially, this was attributed to isotopic fractionation during sample introduction or chromatographic separation^{21,24,25,26} but further studies demonstrated that the drift is due to the Faraday cups desynchronization.^{27,28} This phenomenon has been explained by the slow time response of the amplifier system which can vary between individual collectors when measuring fast changes in input ion currents.²⁹ Therefore, several methods based on the calculation of the time lag between different amplifier responses were proposed to correct for isotope ratios drift during transient signals when coupling either Laser Ablation or GC to a MC-ICP-MS.^{29,30}

We present in this work an evaluation of the main parameters affecting the accuracy and precision of the measurement of compound-specific isotope ratios of Hg by GC-MC-ICP-MS: chromatographic peak width, integration time, number of acquisition points, data treatment strategy and isotope ratio drift correction during peak elution. The accuracy and precision of the optimized methodology were determined with the analysis of the secondary standard NIST RM-8610.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents and materials

The standard reference materials NIST RM-8610 (UM-Almaden) and NIST SRM-3133 were obtained from the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Thallium standard solution was purchased from Absolute Standards Inc. (Hamden, CT, USA). The TI standard was diluted in 3% ultrapure sub-boiled HCl in Milli-Q water ($\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). An acetic acid/sodium acetate buffer (0.1M, pH 4) was prepared by dissolving sodium acetate and acetic acid (Sigma-Aldrich) in Milli-Q water and adjusting to pH 4. The ethylation of inorganic mercury was performed using a 2% (w/v) solution of sodium (tetra-n-ethyl)borate (LGC-Standards, Wesel, Germany) in Milli-Q water. Hexane (Sigma-Aldrich) was employed for the extraction of the derivatised mercury compound.

2.2. Sample preparation for isotope ratio measurements

Working solutions of Hg(II) were prepared in 7 mL glass vials containing 4 mL of acetic acid/acetate buffer (0.1M, pH 4) by the addition of the appropriate amount of the standard solution to obtain a final concentration of 250 ng (of Hg) g⁻¹ in the final organic phase. The mercury species was ethylated and extracted into an organic phase by the addition of 1 mL of hexane and 0.200 mL of sodium (tetra-n-ethyl)borate 2%, followed by 5 minutes of manual shaking. Finally, the organic phase was transferred to a 2 mL glass vial.

2.3. Instrumentation

A gas chromatograph model Agilent 6890N (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) fitted with a split/splitless injector and a DB-5MS capillary column from Agilent J&W Scientific (cross-linked 5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane, 30 m × 0.53 mm i.d. × 1.0 μm) was coupled to a Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer Neptune Plus (ThermoScientific, Bremen, Germany). The GC-MC-ICP-MS interface consisted of a heated metallic block which enables the mixing of the Ar gas flow coming from the MC-ICP-MS (sample gas) with the carrier gas of the GC Column to transfer the eluted Hg species into the ICP source (Figure 1). A cyclonic spray chamber and a PFA concentric nebulizer working at 700 μL min⁻¹ were coupled to the GC-ICP-MS system through a T-piece before the ICP source, allowing the introduction of a wet aerosol of a TI solution for mass bias correction. Thus, the nebulizing gas is used for the nebulization of the TI solution and the sampling gas is used for the transfer of the Hg species eluted from the GC column. The GC-MC-ICP-MS instrumental parameters are summarized in Table 1. All samples and standards were weighted on an analytical balance Metler Toledo MS Semi-micro MA.205DU (0.0001 g). The pH was adjusted with a Basic 20 CRISON pH-meter (Alella, Barcelona, Spain).

2.4. Measurement of compound-specific Hg isotope ratios

The isotopes ¹⁹⁸Hg, ¹⁹⁹Hg, ²⁰⁰Hg, ²⁰¹Hg, ²⁰²Hg, ²⁰³Tl, and ²⁰⁵Tl were simultaneously measured in the Faraday cups L3, L2, L1, C, H1, H2, and H3, respectively. All measurements were performed in a static multicollection mode using the conventional acquisition software of the instrument. The isotopes ²⁰⁴Hg and ¹⁹⁶Hg could not be measured due to the specific Faraday cups configuration of our MC-ICP-MS instrument. ²⁰³Tl and ²⁰⁵Tl were continuously measured for mass bias correction nebulizing a TI solution in 3% HCl. The chromatographic conditions applied in this work are given in Table 1. When measuring Hg isotope ratios in narrow GC chromatographic peaks (2-5 seconds at the peak base) integration times of 0.131 or 0.262 s were evaluated and the separation of Hg species was achieved in 6.75 minutes. When measuring Hg isotope ratios in wide chromatographic peaks, integration times of 0.524 and 1.049 s were evaluated. When

measuring only Hg(II) isotope ratios in wide peaks, a total analysis time of 13.1 minutes was required for each GC run. It is worth noting that for the calculation of a delta value three GC runs are required. If both MeHg and Hg(II) isotope ratios needed to be measured using wide peaks the analysis time of each GC run increased to 19.1 min. Before starting any measurement session, the Faraday-amplifier gains were calibrated and the mass window, lenses, torch position and Ar flows were optimized using the ^{205}Tl signal. The configuration of the Faraday cups was initially performed by nebulisation of a Hg standard solution of 20 ng g^{-1} . However, in order to avoid Hg contamination in the MC-ICP-MS system due to memory effects, mass accuracy was checked and adjusted daily with the measurement of a 20 ng g^{-1} Tl solution.

2.5. Data reduction

Three different approaches for the calculation of compound-specific Hg isotope ratios were compared in this work: Peak Area Integration (PAI), Linear Regression Slope (LRS)^{22,23} and Point by Point (PbP).

2.5.1. Calculation of isotope ratios by peak area integration

Using the PAI method the compound-specific isotope ratio was calculated dividing the sum of the background corrected voltages obtained for each isotope in a selected range of the chromatographic peak as described elsewhere.¹⁶

2.5.2. Calculation of isotope ratios by linear regression slope

The LRS method calculates the isotope ratio as the slope b of a linear fit of a selected range of the isotopic intensities as described in equation (1) where V^{xxx} is the voltage obtained for the isotope xxx, being xxx the mass of the isotopes between ^{199}Hg and ^{204}Hg , and a is the intercept.

$$V^{xxx} = V^{198} \cdot b + a \quad (1)$$

According to the recommendations proposed by Blum and Bergquist³¹ for reporting variations in the natural isotopic composition of Hg, the internal precision of an individual analysis should be reported as 2 times the standard error of the mean, which is equivalent to the standard error of the slope using the LRS method.³² Using the LRS method the internal precision was evaluated using the standard error of the slope as described in equation 2 (adapted from Miller and Miller³³):

$$u_{LRS} = \frac{\sqrt{\frac{\sum(V_{xxx_i} - \hat{V}_{xxx_i})^2}{n-2}}}{\sqrt{\sum(V_{198_i} - \bar{V}_{198})^2}} \quad (2)$$

Note that V_{xxx_i} is the measured voltage and \hat{V}_{xxx_i} the predicted voltage by the linear regression for the isotope xxx in each acquisition point. Therefore, $\sum(V_{xxx_i} - \hat{V}_{xxx_i})^2$ corresponds to the squared sum of residuals and n is the number of acquisition points used to define the regression line. V_{198_i} is the measured voltage for the isotope 198 in each acquisition point and \bar{V}_{198} the average voltage of the selected range of acquisition points. From a practical point of view, both the slope and the standard error of the slope were calculated using the function LINEST in Microsoft Excel. After Peak apex identification using spreadsheet software, an optimized number of 160 acquisition points were selected both before and after the apex leading to a total number of acquisition points of 321.

2.5.3. Calculation of isotope ratios point by point

When applying the PbP method, the isotope ratio is calculated in each acquisition point using background corrected voltages. Then, the average of the isotope ratios measured over a certain range of acquisition points within the transient signal is calculated. In contrast to the LRS method, baseline points of the chromatogram are not included in the selected range. Thus a background correction of the voltage is required. The number of acquisition points within the chromatographic peak ranged from 1 (peak apex) to 21 points. To evaluate the internal precision of the PbP method, the standard error of the mean was calculated using equation (3) (adapted from Miller and Miller³³):

$$u_{PbP} = \sqrt{\frac{n}{n-1} \sum \left(\left(\frac{V_{xxx}}{V_{198}} \right)_i - \left(\frac{V_{xxx}}{V_{198}} \right) \right)^2} \quad (3)$$

2.5.4. Correction of the time-lag between Faraday Cups

The correction model applied in this work assumes that the source of the isotope ratio drift during peak elution is the non-uniform time response of the different amplifiers. Similar to Gourgiotis *et al.*,³⁰ our correction model is based in the assumption that the cup L3 (m/z=198) is the reference on time while the other four cups (L2, L1, C and H1) are delayed. As the time-lag affects mostly the internal precision of the isotope ratio measurement in transient signals, cups H2 and H3, used for ²⁰³Tl and ²⁰⁵Tl, respectively, are not included in this model. Figure S1 in the Supporting information shows that, if the variation of the signal during the time-lag interval, $V_2^{xxx} -$

V_{corr}^{xxx} can be assumed to be linear and proportional to that observed during the integration time, $V_2^{xxx} - V_1^{xxx}$, the slopes of both lines will be the same and those can be described in equation (4) as:

$$\frac{V_2^{xxx} - V_1^{xxx}}{\Delta t_i} = \frac{V_2^{xxx} - V_{corr}^{xxx}}{\Delta t} \quad (4)$$

where Δt_i is the integration time used in the isotope ratio and Δt is the time-lag between the corresponding Faraday cup and the L3 cup. Then, we can calculate the corrected voltage V_{corr} using equations (5).

$$V_{corr}^{xxx} = V_2^{xxx} - \frac{\Delta t}{\Delta t_i} \cdot (V_2^{xxx} - V_1^{xxx}) \quad (5)$$

In these equations V_1 and V_2 are the voltages measured for the isotope xxx by the delayed cup at the beginning and at the end of the integration time (Δt_i). Note that the calculation of V_{corr} by equation (5) requires the previous calculation of the time-lag (Δt) for each cup. If we consider that the time-lag is the only factor affecting the isotope ratio drift, the Δt value can be obtained mathematically. In this work we have calculated the time lag for each cup by minimizing the squared sum of residuals of the linear regression applied to calculate the isotope ratio. The minimization of the residuals directly leads to the minimization of the standard error of the slope or the maximization of the r^2 of the linear regression as done in Claverie *et al.*³⁴ This can be performed using spreadsheet calculation software such as the Excel Solver function avoiding the restriction to negative variables. In the case of PbP method, the Δt value can be obtained iteratively by minimizing the standard error of the mean given in equation (3). This last method is analogue to the minimization of the drift slope as done in Gourgiotis *et al.*³⁰ A comparison of the different correction methods used in the literature for the LRS calculation is given in Figure S2 in the Supporting Information. As can be observed, the final time lag results are equivalent regardless of the calculation method used.

2.5.5. Mass bias correction

The elution of the sample matrix from the GC column may induce plasma instabilities affecting mass bias during the chromatographic peak profile of Hg compounds. To minimise this problem a TI solution was simultaneously nebulized into the ICP source using a microconcentric nebulizer and a cyclonic spray chamber. The TI spray was mixed through a T piece with the Ar flow transporting the gaseous analytes as described in Figure 1. Such “wet” plasma conditions prevent the accumulation of carbon particles in the ICP cones due to the combustion of the organic solvent.^{14,20} The concentration of the TI solution was selected to match the ²⁰⁵Tl voltage

and the peak apex voltage of ^{202}Hg within 10%.¹⁴ Mass bias was then corrected applying the Russel equation as described in equation (6):

$$\left(\frac{{}^{xxx}\text{Hg}}{198\text{Hg}}\right)_{corrected} = \frac{\left(\frac{{}^{xxx}\text{Hg}}{198\text{Hg}}\right)_{measured}}{\left(\frac{W^{xxx}}{W^{198}}\right)^f} \quad (6)$$

W is the isotopic mass of the corresponding isotope and f is the correction factor calculated using equation (7):

$$f = \log\left(\frac{\left(\frac{{}^{205}\text{Tl}}{203\text{Tl}}\right)_{measured}}{\left(\frac{{}^{205}\text{Tl}}{203\text{Tl}}\right)_{theoretical}}\right) \quad (7)$$

Measured Tl isotope ratios were calculated by the LRS procedure (intercept set to zero) within the range of acquisition points selected for the measurement of compound-specific isotope ratios. When working with continuous signals both the PbP and the LRS procedure provide the same values of isotope ratios and uncertainties.³⁸

2.5.6. Calculation of Hg species-specific delta values

Hg species-specific delta values by GC-MC-ICP-MS were calculated using equation (8) after applying a standard-sample-standard bracketing approach using the standard reference material NIST-3133 as delta zero standard.

$$\delta^{xxx}\text{Hg} = \left(\frac{\left(\frac{{}^{xxx}\text{Hg}}{198\text{Hg}}\right)_{sample}}{\left(\frac{{}^{xxx}\text{Hg}}{198\text{Hg}}\right)_{standard}} - 1\right) \times 1000 \quad (8)$$

In equation (8), xxx refers to the mass of the isotopes between ^{199}Hg and ^{202}Hg . The isotope ratio of the standard NIST-3133 is calculated from the average of the isotope ratio measurement before and after the sample. The concentration of the standard was adjusted to match the intensity of that of the sample within 10%.¹⁴ Capital delta values representing MIF were calculated using equation (9) where β_{xxx} is the kinetic mass-dependence scale factor for each isotope: 0.2520 for ^{199}Hg , 0.5024 for ^{200}Hg , and 0.7520 for ^{201}Hg .³¹

$$\Delta^{xxx}\text{Hg} = \delta^{xxx}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times \beta_{xxx}) \quad (9)$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Optimization of Ar flows for compound-specific isotope ratio measurements

Our GC-MC-ICP-MS instrument requires the use of two Ar flows which are mixed before entering into the ICP source through a “t” piece. The nebulizing gas is used for the nebulization of the TI solution and the sampling gas is used for the transfer of the Hg species eluted from the GC column. The optimization of both flows is critical to achieve the maximum sensitivity. Figure 2 shows the voltages obtained for ^{205}Tl and ^{202}Hg when nebulizing a TI solution of 20 ng g^{-1} and injecting $2 \mu\text{L}$ of a Hg(II) solution of 250 ng g^{-1} at different flow rates of nebulizing and sampling gas. As the chromatographic peak width is not significantly affected by the Ar flows, Figure 2 shows the Hg(II) peak height (V) instead of peak area. Under all conditions a total flow of 1.2 L min^{-1} was maintained and the sample gas was increased from 0.2 to 0.8 L min^{-1} . As observed in Figure 2, the highest $^{202}\text{Hg(II)}$ signal was obtained with a sample gas flow of 0.7 L min^{-1} and a nebulizing flow of 0.5 L min^{-1} . The Ar flows were optimised with the TI signal on a daily basis and we found minimal variations in the optimal values.

3.2. Optimization of the chromatographic conditions for compound-specific isotope ratio measurements

Optimum GC separations provide very short transient signals (typically 2-5 s at the peak base). Therefore, the number of acquisition points during the chromatographic peak with high and measurable signals is very small and generally not enough to obtain comparable levels of precision than those obtained when measuring continuous signals at the same voltage levels. Intentional broadening of the chromatographic peaks¹⁴ has been applied in previous works to increase the number of acquisition points to simulate a continuous signal. The use of isothermal temperature programs has been reported for the measurement of compound specific Hg isotope ratios in peaks of 30-60 s width at the peak base.^{14,23}

Initially, we have also applied isothermal temperature programs to obtain the maximum peak width maintaining the voltage higher than 0.5 V for ^{202}Hg at the top of the peak.¹⁴ If Hg isotope ratios are measured for MeHg and Hg(II) in the same sample, the temperature program must include two isothermals of several minutes to elute both species. After a careful optimization we found that one isothermal at 45°C for MeHg and another at 63°C for Hg(II) both for 7 minutes were required to obtain the desired peak broadening. The chromatographic profile for Hg(II) obtained using these conditions is shown in Figure 3b. As can be observed, chromatographic peaks of 30-35 s at the peak base are obtained using T program 2. However, Figure 3c shows that when applying only one isothermal the peak width of Hg(II) decreases to 20-25 s at the peak base. A total acquisition time of 19.1 min was required to separate both Hg species in a sample

but the total analysis time decrease to 13.1 minutes if only Hg(II)-specific isotope ratios are measured. Due to the lack of a delta zero standard for MeHg the optimization of the isotope ratio measurements by GC-MC-ICP-MS was carried out only for Hg(II). Therefore, the GC temperature program 3 given in Table 1 was applied when working with wide chromatographic peaks throughout this work to save time during the measurement sessions.

In order to reduce the analysis time and increase the sensitivity and the chromatographic resolution, we also optimized the measurement of compound-specific Hg isotope ratios in regular GC peaks. Therefore, a conventional GC temperature program employed previously for the simultaneous determination of MeHg, EtHg and Hg(II) by isotope dilution³⁵ was also applied in the optimizations. As can be observed in Figure 3a, the GC temperature program 1 (Table 1) provides transient signals of 2-5 s at the peak base. Figure S3 in the Supporting Information compares two chromatograms of a standard solution containing 250 ng g⁻¹ of Hg(II) obtained with T program 1 and T program 3. As can be observed the elution of Hg(II) is achieved in 3.5 minutes under T program 1. The concentration of the nebulized TI solution was adjusted to obtain a similar voltage than that obtained at the top of the Hg(II) peak. As expected, when working with an isothermal T program the peak height was significantly decreased in T program 3 in comparison with T program 1. As observed in Figure S3, the voltage at the top of the peak decreased from 1.75 to 0.65 V with increasing the retention time and peak width. We can also observed in both chromatograms the distortion of the TI signals when eluting the hexane from the column and a small peak of Hg(0) before hexane elution.³⁵ Hg(0) peak can be due to a contamination problem or the result of Hg(II) reduction during sample preparation. In the latter case this can be a source of isotopic fractionation but in all cases the voltage of the Hg(0) peak was negligible in comparison with Hg(II). Both temperature programs 1 and 3 will be compared in subsequent studies.

3.3. Correction of the time-lag between Faraday cups for compound-specific isotope ratios measurements

Although MC-ICP-MS instruments are designed to allow the simultaneous measurement of isotopic signals, many authors have reported isotope ratio drifts during peak elution. This has been attributed to differences on the time response of the Faraday cups amplifiers when measuring fast changes in input ion currents rather than to chromatographic isotope effects.²⁸ Therefore, the correction of the time lag between cups is expected to improve the internal precision of the isotope ratio measurements. Several methods have been applied to calculate the time lag between different amplifier systems and correct for the isotope ratio drift during transient signals.²⁸⁻³⁰ We assume a linear variation of the signal during the time-lag interval proportional to the variation during the integration time (equation 4). We also assume that the time-lag (Δt) is the only factor affecting the IR drift during peak elution. Under these conditions, using the LRS method, Δt was obtained iteratively by minimizing the squared sum of residuals of the linear regression applied to calculate the isotope ratio. As demonstrated in Figure S2, this method is

equivalent to that proposed by Claverie *et al.*³⁴ which maximized the squared correlation coefficient of the linear regression. Using the PbP method, Δt was obtained iteratively by minimizing the standard error of the mean given in equation (3) which is equivalent to the method of Gourgiotis *et al.*³⁰ which minimized the drift slope.

Table S1 in the Supporting Information shows the Δt values obtained in three different measurement sessions in which we carried out $n=17$ independent GC-MC-ICP-MS injections of 2 μL of a solution containing 250 ng g^{-1} of Hg(II). In all measurements, the GC T program 1 (narrow peaks) and the LRS were applied and the Hg(II)-specific isotope ratios were measured using an integration time of 0.131 s and 321 acquisition points. After peak apex identification, 160 acquisition points were selected before and after the apex leading to a total number of acquisition points of 321. The values obtained for cups L2, L1, C and H1 were 2.8 ± 0.2 , 1.8 ± 0.2 , 3.4 ± 0.2 and 2.0 ± 0.2 ms, respectively. The time lags shown in Table S1 are significantly lower than the integration times evaluated in this work except for the case of the shortest integration time of 0.131 s. Thus, isotope ratio drift is expected to be less pronounced for longer integration times (e.g. 1 s or longer). Figure 4 shows a representative chromatographic peak profile and the isotope ratio obtained using 0.131 s (Figure 4a) and 0.262 s (Figure 4b) for the narrow GC peak, and using 0.524 s (Figure 4c) and 1.049 s (Figure 4d) for the wide GC peaks. As can be observed in Figure 4, the proposed method corrects for isotope ratio drifts which are more pronounced for lower integration times. The average values of Table S1 were used for correction in further measurements to reduce the complexity of the data treatment.

Figure 5 shows the comparison of the internal precision of time-lag corrected and uncorrected Hg(II)-specific $^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$ isotope ratio both applying the LRS and the PbP methods in narrow and wide GC peaks obtained for $n=17$ independent replicates measured under different conditions. Figure 5a shows the results obtained applying the LRS method in narrow GC peaks using 0.131 s of integration time and 21, 81, 161 and 481 acquisition points while Figure 5b shows the results obtained using wide GC peaks and 1.049 s of integration time for 21 and 161 acquisition points. Table S2 shows the raw data for 202/198 isotope ratios and internal precisions (as 2SE) obtained under all conditions assayed using the LRS method. Alternatively, Figure 5c shows the results obtained applying the PbP method in narrow peaks with 0.131 s integration time and 5 acquisition points while Figure 5d shows those obtained in wide peaks, 1.049 s integration time and 5 acquisition points. As can be observed, when applying the LRS method and working with narrow GC peaks and 0.131 s integration time (Figure 5a), the time lag correction improves the internal precision of the Hg(II)-specific $^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$ isotope ratios in all cases, but the effect is more pronounced when a lower number of acquisition points are considered (21-161). For a number of 481 acquisition points corrected and uncorrected isotope ratios show similar internal precisions. When applying the LRS method in wide peaks and 1.049 s integration time, there was not a significant difference between the internal precision of corrected or uncorrected isotope ratios (Table S2). When applying the PbP method, the internal precision of the isotope ratios improves with the time lag correction only when using 0.131 s as

integration time. Those results confirm that the proposed time lag correction improves the internal precision of isotope ratios when working with low integration times. Also, as observed in Figure 4, the isotope ratio drift is less pronounced with higher integration times and wider GC peak profiles.

3.4. Evaluation of the accuracy and precision of Hg species-specific delta values.

In order to optimize the accuracy and precision of Hg-species-specific delta values by GC-MC-ICP-MS we evaluated the following parameters: i) calculation method, ii) number of acquisition points iii) GC peak width and iv) integration time. To facilitate the standardization and intercomparison of our results with other laboratories, delta values and their associate uncertainties were calculated following the suggestions proposed by Blum and Bergquist,³¹ for reporting variations in the natural isotopic composition of Hg. The external precision or reproducibility of our methodology was thus expressed as 2 times the standard deviation (2SD) of several measurements of delta values versus the delta zero standard NIST-3133. According to previous works in this field^{14,23,158,181}, an acceptable external precision for compound-specific delta values should be lower than 0.5 ‰ as 2SD.

The selection of an optimal range of acquisition points has been carried out in previous works^{14,23} selecting different chromatographic peak percentages. However, in order to facilitate the comparison between the different data treatment strategies applied in this work, we have evaluated the number of acquisition points of the chromatogram rather than peak percentages. Three different data reduction strategies were evaluated in this work: Linear Regression Slope (LRS), Point by Point ratio measurements (PbP) and Peak Area Integration (PAI). The three methods were applied to calculate δ values in narrow GC peaks (2-5 s) and wide GC peaks (20-25 s). In addition, different integration times were evaluated for each peak profile. When working with narrow GC peaks, the measurements were performed with shorter integration times (0.131 s and 0.262 s) whereas longer integration times of 0.524 and 1.049 s were used when working with wider peaks as recommended previously.¹⁴

3.4.1. Analysis of NIST-3133 vs NIST-3133

The first optimizations were carried out calculating the δ values of NIST-3133 bracketed with the same NIST-3133. This study was carried out in four different days performing in each session $n=17$ independent GC-MC-ICP-MS injections of 2 μL of a solution containing 250 ng g^{-1} of Hg(II). The first session was performed applying GC program 1 (narrow peak) and 0.131 s integration time, the second applying the GC program 1 (narrow peak) and 0.262 s integration time, the third applying the GC program 3 (wide peak) and 0.524 s integration time and the last

session applying GC program 3 (wide peak) and 1.049 s integration time. **Figure 6** shows the average of $\delta^{202}\text{Hg(II)}$ (‰), and its associated external precision ($\pm 2\text{SD}$) represented as error bars for $n=8$ independent measurements under the different experimental conditions assayed. **Figure S4** of the supporting information shows the results obtained for $\delta^{199}\text{Hg(II)}$, $\delta^{200}\text{Hg(II)}$ and $\delta^{201}\text{Hg(II)}$ and **Table S3** of the supporting information shows the raw data obtained for all delta values and their associated external precisions in all measurement sessions.

Our results show that the best external precision was obtained using the LRS method working with narrow GC peaks, 0.131 s of integration time and selecting between 321 and 641 acquisition points. Under these conditions the 2SD of all delta values ranged from 0.236 to 0.590 ‰. These results demonstrate the importance of including enough number of acquisition points from the background when working with the LRS method. When using 0.131 s and a lower number of acquisition points, the 2SD values increased significantly (from 0.420 to 0.874 ‰ for 81 acquisition points and from 0.575 to 1.291 ‰ for 21 acquisition points). A worse external reproducibility using the LRS method was also obtained when working with wide chromatographic peaks as the best 2SD values ranged from 0.341 to 0.591 ‰ with 81 acquisition points. Using the PAI method, the best external precision was obtained with narrow GC peaks, 0.131 s of integration time and 41 or 81 acquisition points. Using these conditions, the 2SD of the delta values ranged from 0.433 to 0.641 ‰. Worse 2SD values were obtained using PAI and wide chromatographic peaks as the best 2SD for the delta values ranged from 0.508 to 1.107 ‰ for 1.049 s integration time and 21 acquisition points. Finally, when using the PbP method the external precisions obtained using 0.131 s integration time, narrow peaks and 21 acquisition points (0.547-0.845 ‰) were comparable to those obtained with wide peaks, 1.049 s of integration time and 5 acquisition points (0.485-0.885 ‰).

Previous works on the measurement of Hg isotope ratios in transient signals applied isothermal temperature programs to increase the chromatographic peak width and hence the number of acquisition points. Peak area integration was initially applied as data reduction strategy obtaining an external 2SD precision of 0.56 ‰ for $\delta^{202}\text{Hg}$.¹⁴ More recently, it was demonstrated that improved precision and accuracy was obtained applying LRS with wide chromatographic peaks (0.2-0.5‰ for $\delta^{202}\text{Hg}$)²³. However, as shown in Table 1 the use of isothermal GC temperature programs requires a significantly longer chromatographic run than those applied in conventional GC separations. In addition, when working with wide peaks, the chromatographic separation of MeHg and Hg(II) from other interfering Hg species is compromised and may lead to error in the measurement of species-specific isotopic compositions in real samples. Our results demonstrate for the first time that measuring Hg isotope ratios in transient signals of narrow GC peaks provides a better external precision than when working with wide chromatographic peaks allowing the possibility of processing a higher number of samples with a better chromatographic resolution and a higher sensitivity. Finally, we also evaluated the influence of the time-lag correction of the Faraday cups in the external precision of Hg species-specific delta values.

Figure S5 shows that time lag correction has no effect either in the accuracy or in the external precision of the delta values when applying either the LRS method or the PbP method.

3.4.2. Analysis of NIST-3133 and NIST RM 8610 versus NIST-3133 using the optimized conditions.

According to the results obtained in section 3.4.1 we selected the LRS method for data reduction, an integration time of 0.131 s and 321 acquisition points for further measurements. Using these conditions, we evaluated the accuracy and external precision of our method. First, we evaluated the external precision of the method by calculating the δ values and Δ values of NIST-3133 bracketed with NIST-3133 from the Hg(II)-specific isotope ratios measured in $n=25$ independent replicates measured in three different days. As can be observed in Table 2, the external precisions ranged from 0.24 to 0.49 ‰. Secondly, we calculated the δ values and Δ values of NIST RM 8610 (new UM-Almaden) bracketed with NIST-3133 from the Hg(II)-specific isotope ratios measured in $n=25$ independent replicates measured in three different days. As can be observed in Table 2, the obtained δ values and Δ values, were in agreement with the certified values obtained by Cold Vapor Generation. The external precision of the δ values and Δ values obtained in the analysis of this material ranged from 0.21 to 0.40 ‰. The obtained external precision was similar to those previously reported²³ using wide chromatographic peaks and the LRS method (0.2-0.5‰ for $\delta^{202}\text{Hg}$).

4. CONCLUSIONS

This is the first time that the accuracy and precision of Hg species-specific isotope ratios and delta values obtained by GC-MC-ICP-MS is evaluated with narrow GC peaks. Our work demonstrates that, in our instrument, a better external reproducibility is obtained when working with narrow peaks than when working with wider peaks obtained from the application of isothermal temperature programs. This could be attributed to the better sensitivity in the peak apex and the increased number of data points with short integration times provided when working with narrow peaks. However, in comparison with previously published approaches based on wide GC peaks²³ we provide the same level of accuracy and external reproducibility of Hg compound specific delta values. The measurement of isotope ratios in narrow transient signals provides two important advantages when analyzing real samples. First, the analysis time per sample is reduced as the use of isothermal GC temperature programs requires significantly longer chromatographic runs than those require in conventional GC separations. Secondly, a better chromatographic resolution is obtained. The chromatographic separation of MeHg and Hg(II) from other interfering Hg species may be compromised when analyzing real samples leading to errors in the measurement of species-specific isotopic compositions. A higher sample throughput and a lower risk of

interferences is thus provided with the methodology developed in this work in comparison with previously reported approaches.

ACKNOWLEDGEMENTS

Financial support from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) through Project CTQ2015-70366P is acknowledged. SQA also acknowledges MINECO for the provision of a predoctoral grant BES-2013-062959. This work has been performed within the scope of an EMRP Organisation Research Excellence Grant, awarded in accordance with the EURAMET process to complement the JRP “Traceability for mercury measurements” (ENV51 MeTra). The EMRP is jointly funded by the EMRP participating countries within EURAMET and the European Union. Dr. Clay W. Davis (NIST) and Dr. Sylvain Berail (CNRS) are acknowledged for kindly providing the NIST RM 8610 and the UM Almaden standard, respectively.

REFERENCES

- 1 C. H. Lamborg, C. R. Hammerschmidt, K. L. Bowman, G. J. Swarr, K. M. Munson, D. C. Ohnemus, P. J. Lam, L. Heimbürger, M. J. A. Rijkenberg and M. A. Saito, *Nature*, 2014, 512, 65–68.
- 2 N. E. Selin, *Annu. Rev. Environ. Resour.*, 2009, 34, 43–63.
- 3 B. A. Bergquist and J. D. Blum, *Elements*, 2009, 5, 353–357.
- 4 Z. Pedrero-Zayas, O. F. X. Donard and D. Amouroux, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016, 408, 2641–2648.
- 5 E. Young, A. Galy and H. Nagahara, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2002, 66, 1095–1104.
- 6 A. L. Buchachenko, *J. Phys. Chem. A*, 2001, 105, 9995–10011.
- 7 J. Bigeleisen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, 93, 9393–9396.
- 8 E. A. Schauble, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2007, 71, 2170–2189.
- 9 J. E. Sonke, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2011, 75, 4577–4590.
- 10 L. Lefticariu, J. D. Blum and J. D. Gleason, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, 45, 1724–1729.
- 11 A. Biswas, J. D. Blum, B. A. Bergquist, G. J. Keeler and Z. Xie, *Environ. Sci. Technol.*, 2008, 42, 8303–8309.
- 12 L. S. Sherman, J. D. Blum, G. J. Keeler, J. D. Demers and J. T. Dvonch, *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46, 382–390.
- 13 L. E. Gratz, G. J. Keeler, J. D. Blum and L. S. Sherman, *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44, 7764–7770.
- 14 V. N. Epov, P. Rodríguez-González, J. E. Sonke, E. Tessier, D. Amouroux, L. M. Bourgoïn and O. F. X. Donard, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 3530–3538.

- 15 P. Rodríguez-González, V. N. Epov, R. Bridou, E. Tessier, R. Guyoneaud, M. Monperrus and D. Amouroux, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43, 9183–9188.
- 16 P. Rodríguez-González, V. N. Epov, C. Pecheyran, D. Amouroux and O. F. X. Donard, *Mass Spectrom. Rev.*, 2011, 31, 504–521.
- 17 V. Perrot, J. Masbou, M. V. Pastukhov, V. N. Epov, D. Point, S. Bérail, P. R. Becker, J. E. Sonke and D. Amouroux, *Metallomics*, 2016, 8, 170–178.
- 18 J. Masbou, D. Point, G. Guillou, J. E. Sonke, B. Lebreton and P. Richard, *Anal. Chem.*, 2015, 87, 11732–11738.
- 19 J. Terán-Baamonde, S. Bouchet, E. Tessier and D. Amouroux, *J. Chromatogr. A*, 2018, 1547, 77–85.
- 20 J. Masbou, D. Point and J. E. Sonke, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, 28, 1620–1628.
- 21 E. M. Krupp, C. Pécheyran, S. Meffan-Main and O. F. X. Donard, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2001, 370, 573–580.
- 22 J. Fietzke, V. Liebetrau, D. Günther, K. Gürs, K. Hametner, K. Zumholz, T. H. Hansteen and A. Eisenhauer, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 955.
- 23 V. N. Epov, S. Bérail, M. Jimenez-Moreno, V. Perrot, C. Pecheyran, D. Amouroux and O. F. X. Donard, *Anal. Chem.*, 2010, 82, 5652–5662.
- 24 R. D. Evans, H. Hintelmann and P. J. Dillon, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16, 1064–1069.
- 25 E. M. Krupp, C. Pécheyran, S. Meffan-Main and O. F. X. Donard, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 378, 250–255.
- 26 I. Günther-Leopold, B. Wernli, Z. Kopajtic and D. Günther, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 378, 241–249.
- 27 M. Dzurko, D. Foucher and H. Hintelmann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 393, 345–355.
- 28 T. Hirata, Y. Hayano and T. Ohno, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 1283–1288.
- 29 T. Pettke, F. Oberli, A. Audétat, U. Wiechert, C. R. Harris and C. A. Heinrich, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, 26, 475–492.
- 30 A. Gourgiotis, S. Bérail, P. Louvat, H. Isnard, J. Moureau, A. Nonell, G. Manhès, J. L. Birck, J. Gaillardet, C. Pécheyran, F. Chartier and O. F. X. Donard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2014, 29, 1607–1617.
- 31 J. D. Blum and B. A. Bergquist, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 353–359.
- 32 J. Á. Rodríguez-Castrillón, S. García-Ruiz, M. Moldovan and J. I. García Alonso, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, 27, 611–618.
- 33 J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1984
- 34 F. Claverie, A. Hubert, S. Berail, A. Donard, F. Pointurier, and C. Pécheyran, *Anal. Chem.*, 2016, 88, 4375–4382
- 35 S. Queipo-Abad, P. Rodríguez-González, W. C. Davis and J. I. García Alonso, *Anal. Chem.*, 2017, 89, 6731–6739.

TABLES

Table 1. GC-MC-ICP-MS operating conditions.

GC		Agilent 6890N							
Carrier gas	He								
Column	DB-5MS (5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane, 30 m×0.53 mm i.d.×1.0 µm)								
Injector temperature	250 °C								
Volume of injection	2 µL								
Injector purge time	1 min								
GC-ICP-MS Interface temperature	270 °C								
GC program name	Program 1	Program 2	Program 3						
Initial temperature	60°C	45°C	45°C						
Initial Time	1 min	7 min	1 min						
Ramp 1	40 °C min ⁻¹	50 °C min ⁻¹	50 °C min ⁻¹						
Final temperature 1	250°C	63°C	74°C						
Final time 1	1 min	7 min	7 min						
Ramp 2		50 °C min ⁻¹	50 °C min ⁻¹						
Final temperature 2		250°C	250°C						
Final time 2		1 min	1 min						
Total analysis time	6.8 min	19.1 min	13.1 min						
MC-ICP-MS		Thermo Scientific - Neptune Plus							
RF Power	1200 W								
Resolution mode	Medium								
Integration times	0.131 s or 0.262 s (program 1)				0.524 s or 1.049 s (program 2 or 3)				
Cycles/Blocks	2500 or 1200 (program 1)				1200 or 600 (program 2 or 3)				
Sample Ar gas flow	0.7 L min ⁻¹								
Nebulization Ar gas flow	0.5 L min ⁻¹								
Cooling Ar gas flow	15.2 L min ⁻¹								
Auxiliary Ar gas flow	0.8 L min ⁻¹								
Faraday Cups Configuration	L4	L3	L2	L1	C	H1	H2	H3	H4
		¹⁹⁸ Hg	¹⁹⁹ Hg	²⁰⁰ Hg	²⁰¹ Hg	²⁰² Hg	²⁰³ Tl	²⁰⁵ Tl	

Table 2. Hg delta values of NIST SRM 3133 and NIST RM 8610 calculated versus NIST SRM 3133. Uncertainty of the values corresponds to the external precision expressed as 2SD of the mean of n=25 replicates measured in 3 different measurement days for each material.

	$\delta^{199}\text{Hg}$	$\delta^{200}\text{Hg}$	$\delta^{201}\text{Hg}$	$\delta^{202}\text{Hg}$	$\Delta^{199}\text{Hg}$	$\Delta^{200}\text{Hg}$	$\Delta^{201}\text{Hg}$
NIST SRM 3133 (n=25)	0.00 ±0.29	0.02±0.43	0.01±0.49	0.05±0.43	-0.01±0.24	-0.01±0.29	-0.02±0.32
NIST RM 8610 (n=25)	-0.17±0.40	-0.28±0.38	-0.45±0.35	-0.60±0.34	-0.02±0.34	0.02±0.28	0.00±0.21
Certified values for NIST RM 8610	-0.17±0.01	-0.27±0.02	-0.46±0.02	-0.56±0.03	-0.03±0.02	0.00±0.01	-0.04±0.01

FIGURES

Figure 1. Schematic analytical setup of the GC-MC-ICP-MS used in this work for the measurement of compound-specific Hg isotope ratios.

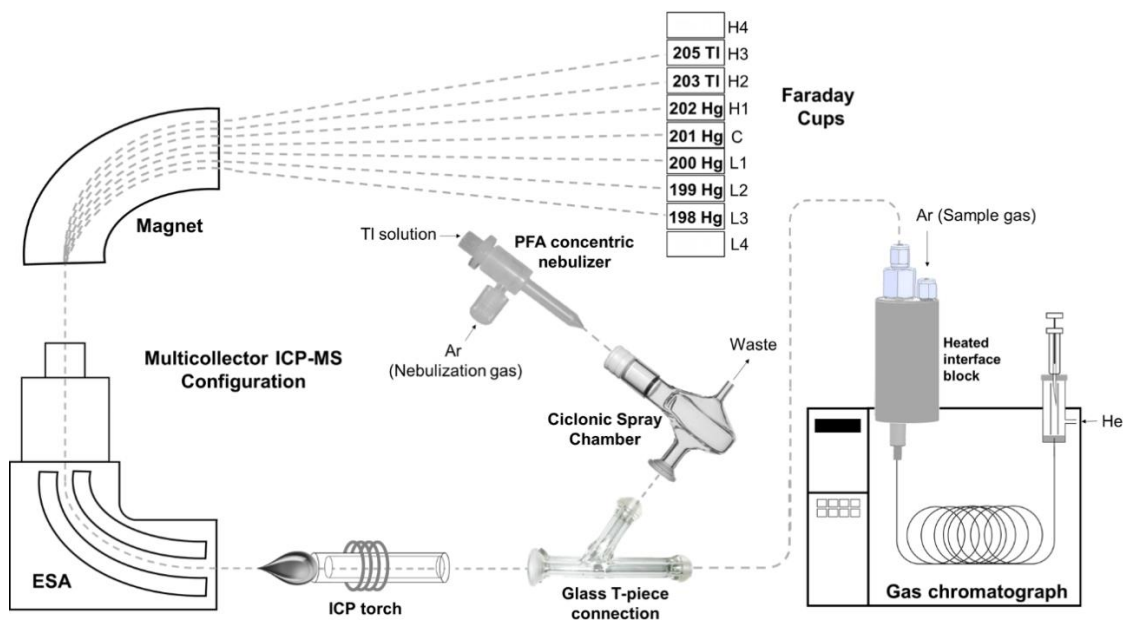


Figure 2. Optimization of Ar flows of the GC-MC-ICP-MS hyphenated system used in this work.

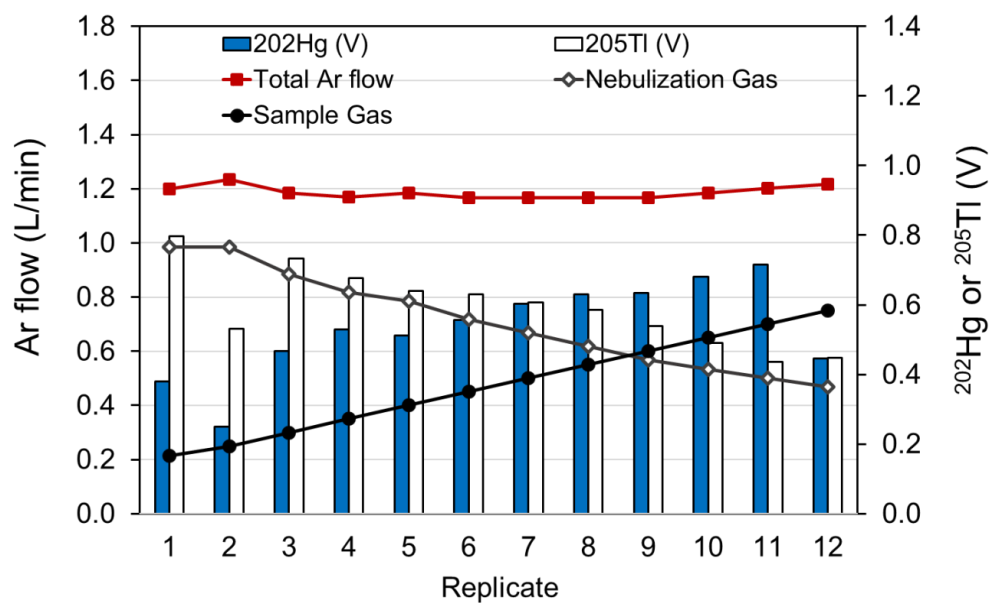


Figure 3. Comparison of the chromatographic peak profile of Hg(II) obtained for the isotope ^{202}Hg by GC-MC-ICP-MS injecting $2\ \mu\text{L}$ of a solution containing $250\ \text{ng g}^{-1}$ of Hg(II) when using a) T program 1, b) T program 2 and c) T program 3.

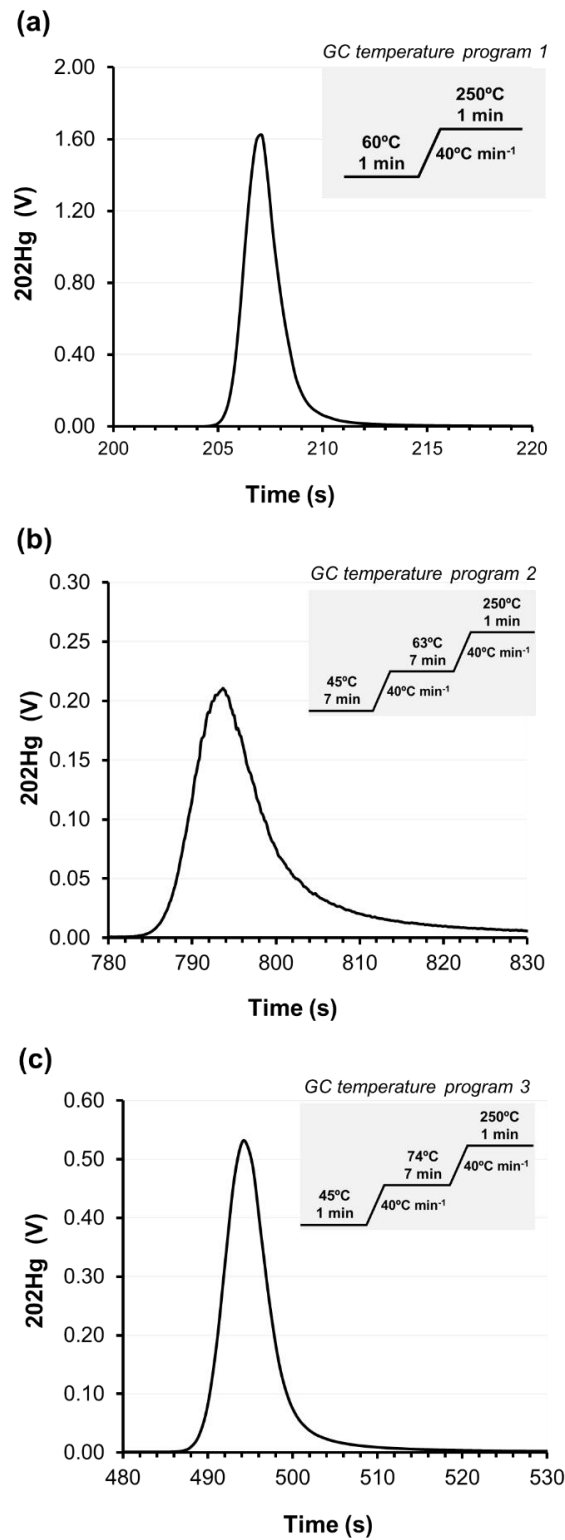


Figure 4. Example of a representative time-lag corrected and uncorrected $^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$ isotope ratio (not corrected for mass bias) during Hg(II) elution when injecting 2 μL of a solution containing 250 ng g^{-1} of Hg(II) (NIST 3133) using integration times of a) 0.131 s and b) 0.262 s for narrow GC peaks, and c) 0.524 s and d) 1.049 s for wide GC peaks.

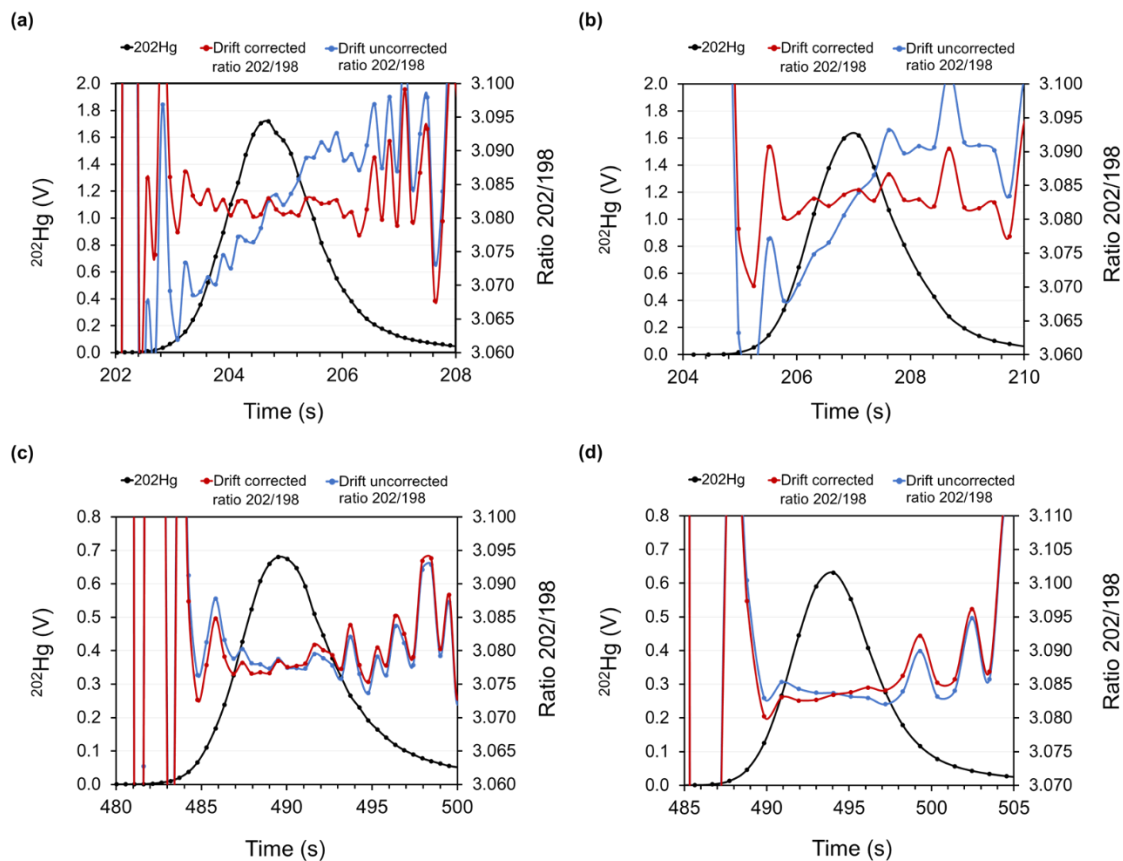


Figure 5. Time-lag corrected and uncorrected $^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$ isotope ratios (mass bias corrected) of NIST 3133 measured by GC-MC-ICP-MS using: a) LRS method, narrow GC peak, 0.131 s integration time, 21, 81, 161 and 481 acquisition points; b) LRS method, wide GC peak, 1.049 s integration time, 21 and 161 acquisition points; c) PbP method, narrow GC peak, 0.131 s integration time and 5 acquisition points; d) PbP method, wide GC peak, 1.049 s integration time and 5 acquisition points. Error bars correspond to the internal precision of the isotope ratios expressed as two times the standard error (2SE).

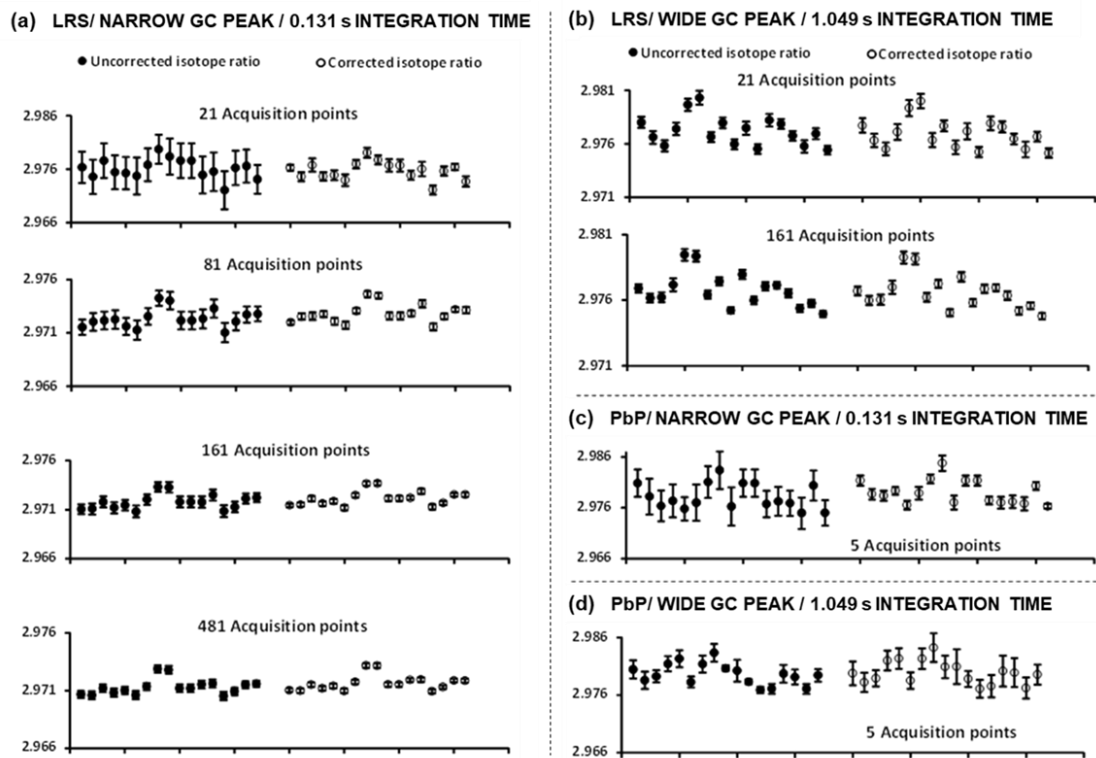
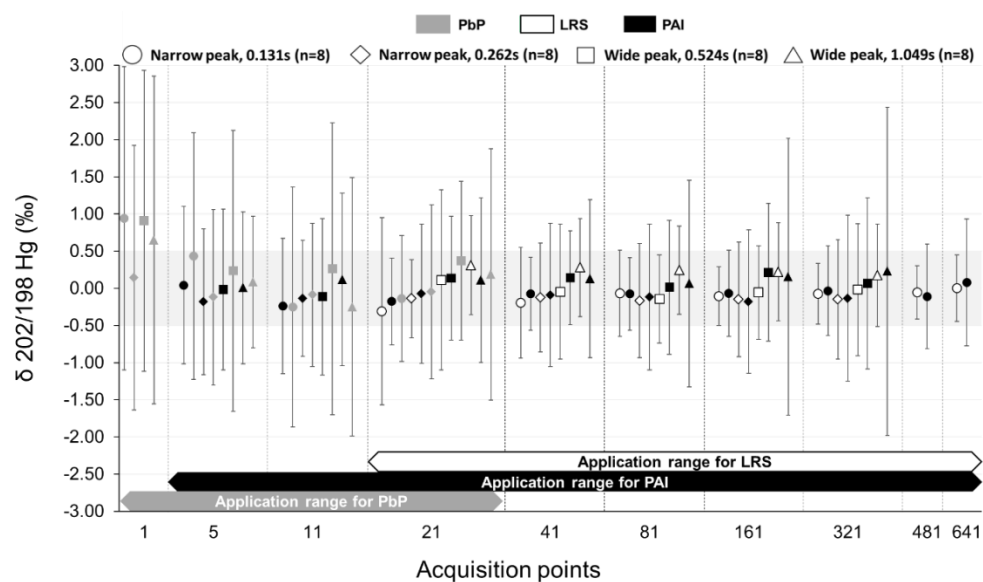


Figure 6. $\delta^{202}\text{Hg(II)}$ (‰) obtained under different experimental conditions when analyzing NIST-3133 versus NIST-3133. Error bars represent the associated external precision ($\pm 2\text{SD}$) for $n=8$ independent measurements. An optimal external precision interval of ± 0.50 ‰ based on previous studies^{14,23} is highlighted.



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Measurement of Compound-Specific Hg isotopic composition in narrow transient signals by Gas Chromatography coupled to Multicollector ICP-MS

Silvia Queipo-Abad, Pablo Rodríguez-González*, José Ignacio García Alonso

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

*Author for correspondence: rodriguezpablo@uniovi.es

Figure S1. Representation of the time-lag between Faraday Cup amplifiers. Cup L3 is taken as reference cup. V_1 and V_2 are the voltages measured for the isotope xxx by the delayed cup, at the beginning and at the end of the integration time. V_{corr} represents the voltage of the delayed cup after correction. The calculation of V_{corr} is done by linear interpolation between V_1 and V_2 .

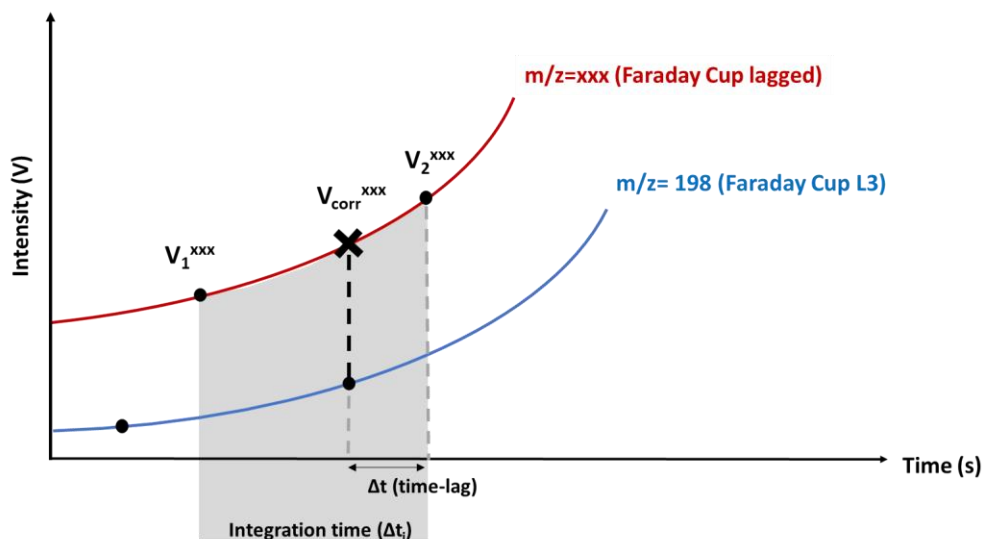


Figure S2. Determination of the time lag for cup H1 (202 m/z) by the linear regression procedure (LRS) using different optimisation criteria.

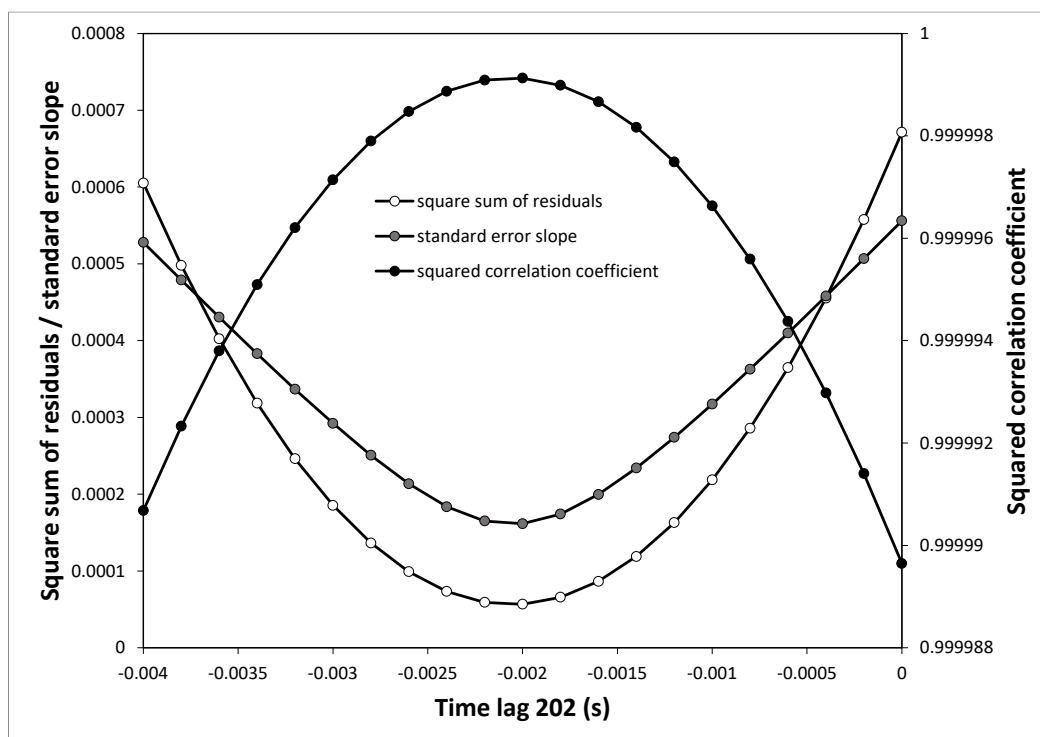


Figure S3. GC-MC-ICP-MS chromatogram for ^{202}Hg injecting 2 μL of a solution containing 250 ng g^{-1} of $\text{Hg}(\text{II})$ obtained with: a) T program 1 and b) T program 3. The continuous signals correspond to ^{203}Tl and ^{205}Tl , introduced by nebulization.

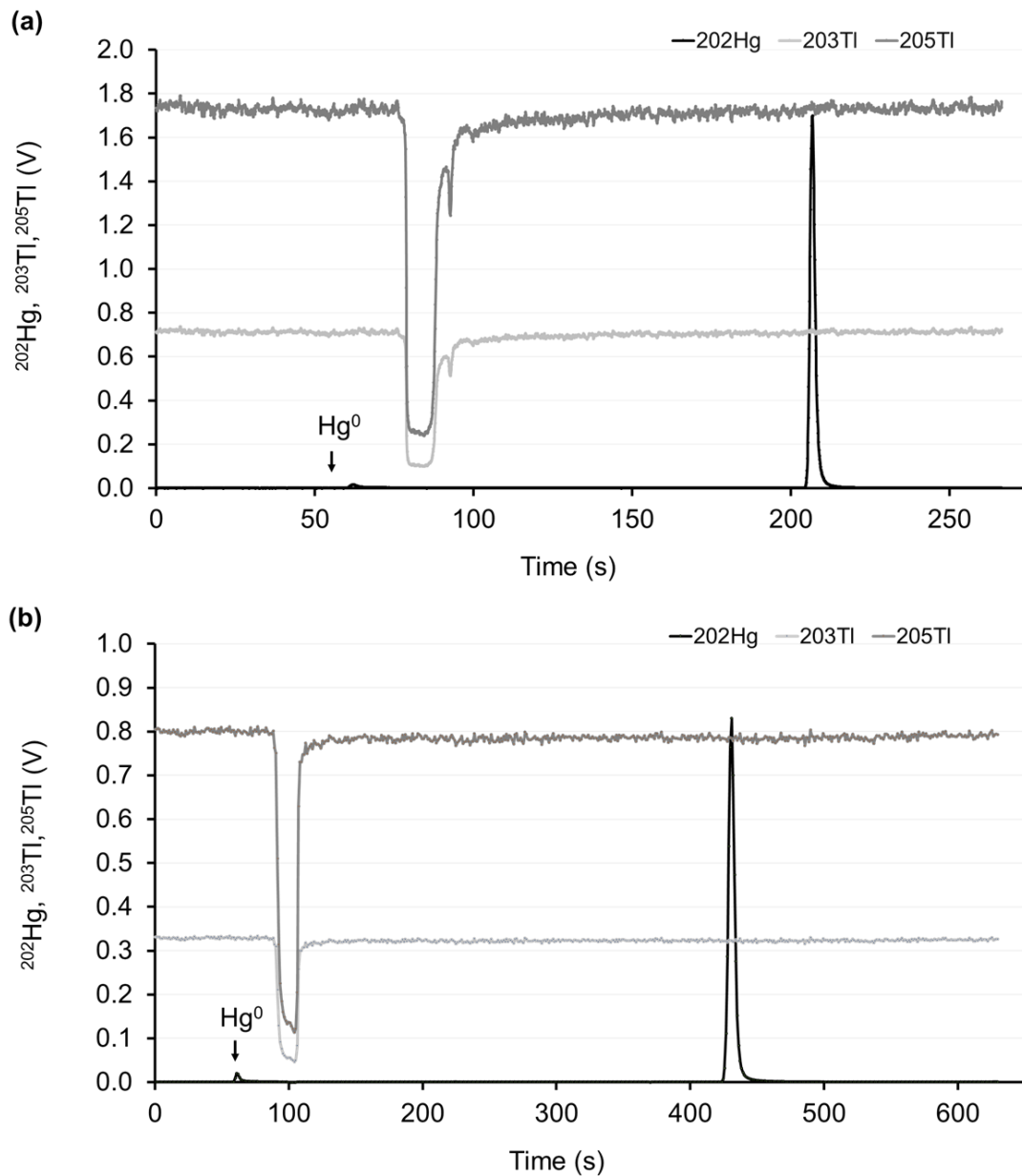
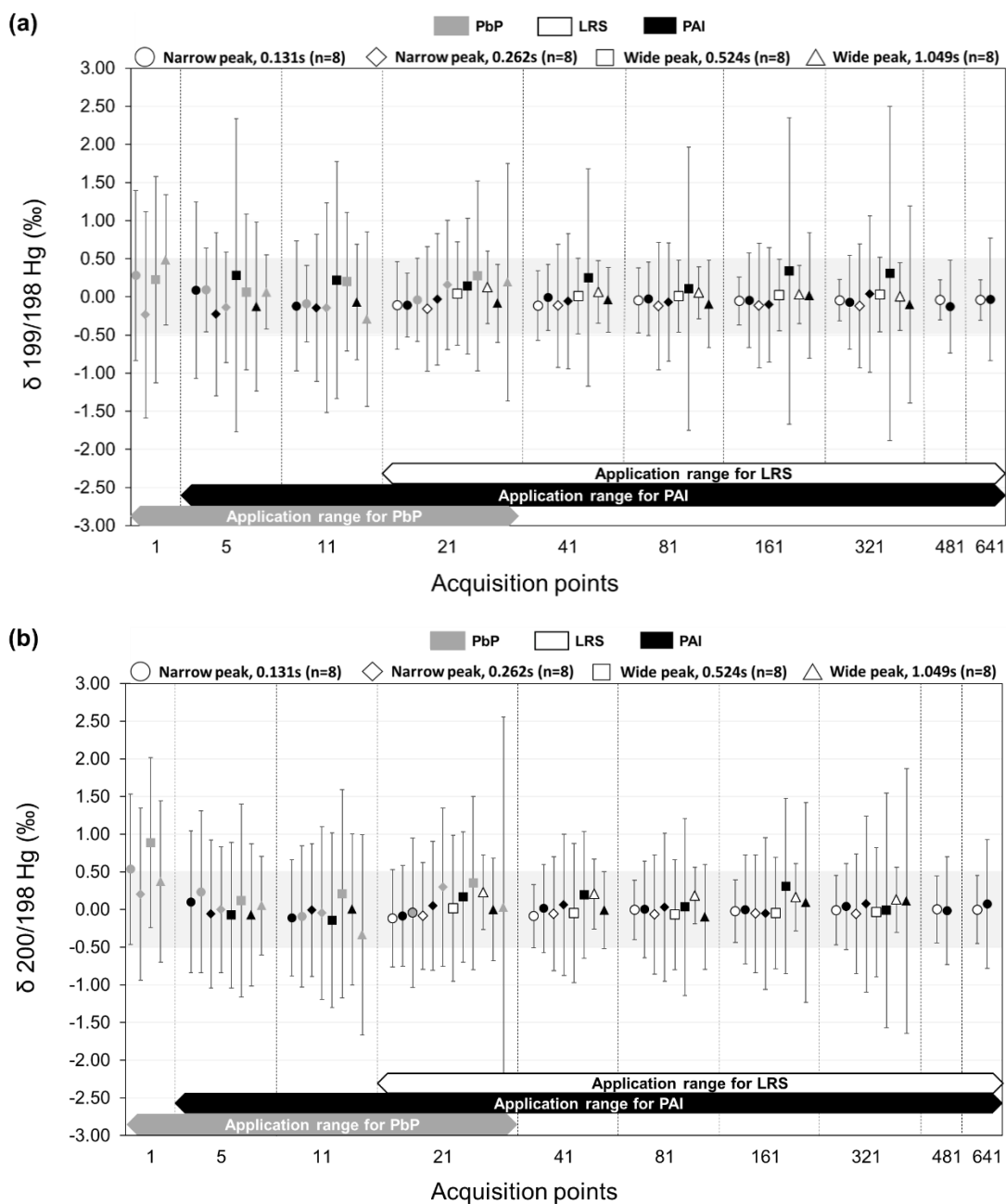


Table S1. Time-lag values (s) for Faraday cups L2, L1, C and H1 obtained in three independent analytical sessions of n=17 injections of 2 μ L of a solution containing 250 ng g⁻¹ of Hg(II).

Replicate	Δt L2 (m/z=199)			Δt L1 (m/z=200)			Δt C (m/z=201)			Δt H1 (m/z=202)		
	Session 1	Session 2	Session 3	Session 1	Session 2	Session 3	Session 1	Session 2	Session 3	Session 1	Session 2	Session 3
1	-0.0030	-0.0029	-0.0030	-0.0021	-0.0019	-0.0019	-0.0031	-0.0036	-0.0031	-0.0017	-0.0022	-0.0019
2	-0.0030	-0.0031	-0.0028	-0.0018	-0.0021	-0.0019	-0.0031	-0.0036	-0.0030	-0.0019	-0.0021	-0.0019
3	-0.0025	-0.0030	-0.0029	-0.0014	-0.0019	-0.0018	-0.0030	-0.0035	-0.0035	-0.0016	-0.0022	-0.0020
4	-0.0026	-0.0029	-0.0027	-0.0019	-0.0019	-0.0018	-0.0036	-0.0036	-0.0035	-0.0020	-0.0021	-0.0018
5	-0.0025	-0.0029	-0.0030	-0.0018	-0.0020	-0.0019	-0.0034	-0.0036	-0.0038	-0.0019	-0.0020	-0.0020
6	-0.0031	-0.0029	-0.0028	-0.0018	-0.0018	-0.0017	-0.0034	-0.0033	-0.0033	-0.0018	-0.0018	-0.0020
7	-0.0031	-0.0031	-0.0030	-0.0018	-0.0020	-0.0018	-0.0036	-0.0035	-0.0036	-0.0019	-0.0022	-0.0019
8	-0.0023	-0.0029	-0.0029	-0.0012	-0.0018	-0.0019	-0.0030	-0.0033	-0.0035	-0.0015	-0.0020	-0.0023
9	-0.0030	-0.0028	-0.0028	-0.0018	-0.0019	-0.0019	-0.0032	-0.0035	-0.0034	-0.0020	-0.0021	-0.0022
10	-0.0025	-0.0025	-0.0028	-0.0015	-0.0014	-0.0020	-0.0030	-0.0030	-0.0036	-0.0017	-0.0017	-0.0022
11	-0.0026	-0.0028	-0.0029	-0.0015	-0.0018	-0.0019	-0.0033	-0.0035	-0.0035	-0.0017	-0.0020	-0.0022
12	-0.0024	-0.0028	-0.0031	-0.0017	-0.0019	-0.0020	-0.0034	-0.0034	-0.0040	-0.0019	-0.0019	-0.0025
13	-0.0028	-0.0028	-0.0028	-0.0017	-0.0020	-0.0020	-0.0034	-0.0034	-0.0035	-0.0019	-0.0020	-0.0021
14	-0.0031	-0.0031	-0.0028	-0.0021	-0.0021	-0.0019	-0.0036	-0.0036	-0.0033	-0.0020	-0.0020	-0.0021
15	-0.0029	-0.0028	-0.0028	-0.0019	-0.0018	-0.0018	-0.0032	-0.0032	-0.0034	-0.0018	-0.0021	-0.0020
16	-0.0029	-0.0028	-0.0027	-0.0019	-0.0017	-0.0016	-0.0033	-0.0033	-0.0032	-0.0019	-0.0020	-0.0018
17	-0.0024	-0.0029	-0.0029	-0.0014	-0.0019	-0.0016	-0.0030	-0.0033	-0.0034	-0.0015	-0.0020	-0.0019
Average (sec) \pm 1SD	-0.0028 \pm 0.0002			-0.0018 \pm 0.0002			-0.0034 \pm 0.0002			-0.0020 \pm 0.0002		

Figure S4. (a) $\delta^{199}\text{Hg(II)}$, (b) $\delta^{200}\text{Hg(II)}$ and (c) $\delta^{201}\text{Hg(II)}$ (‰) obtained under different experimental conditions when analyzing NIST 3133 versus NIST 3133. Error bars represent the associated external precision ($\pm 2\text{SD}$) for $n=8$ independent measurements. An optimal external precision interval of ± 0.50 ‰ based on previous studies (Epov *et al.*, 2010, 2008) is highlighted.



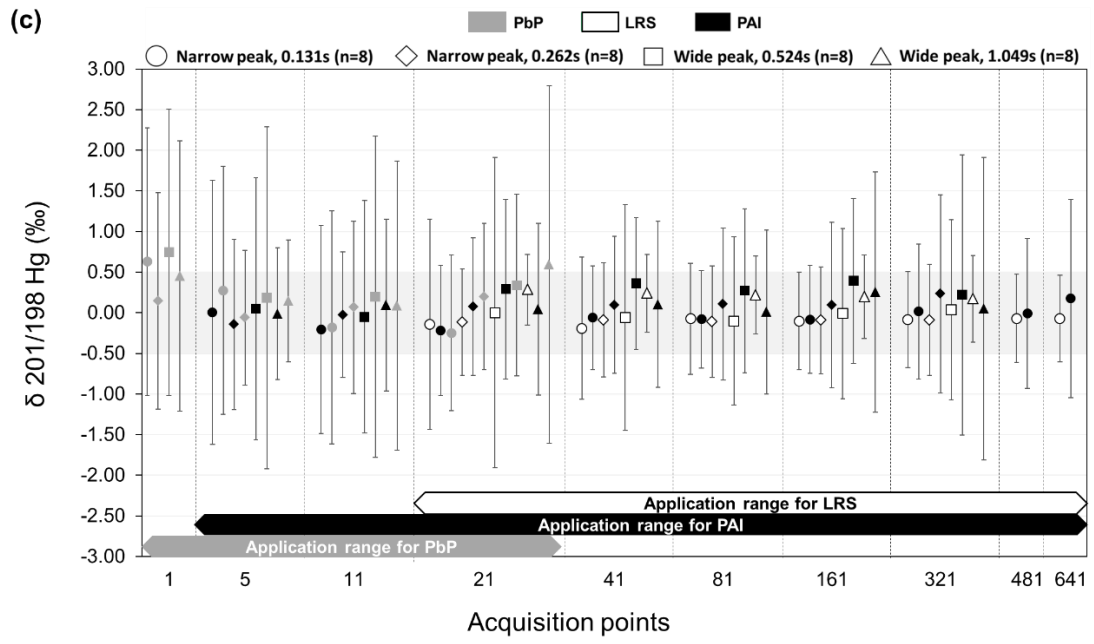
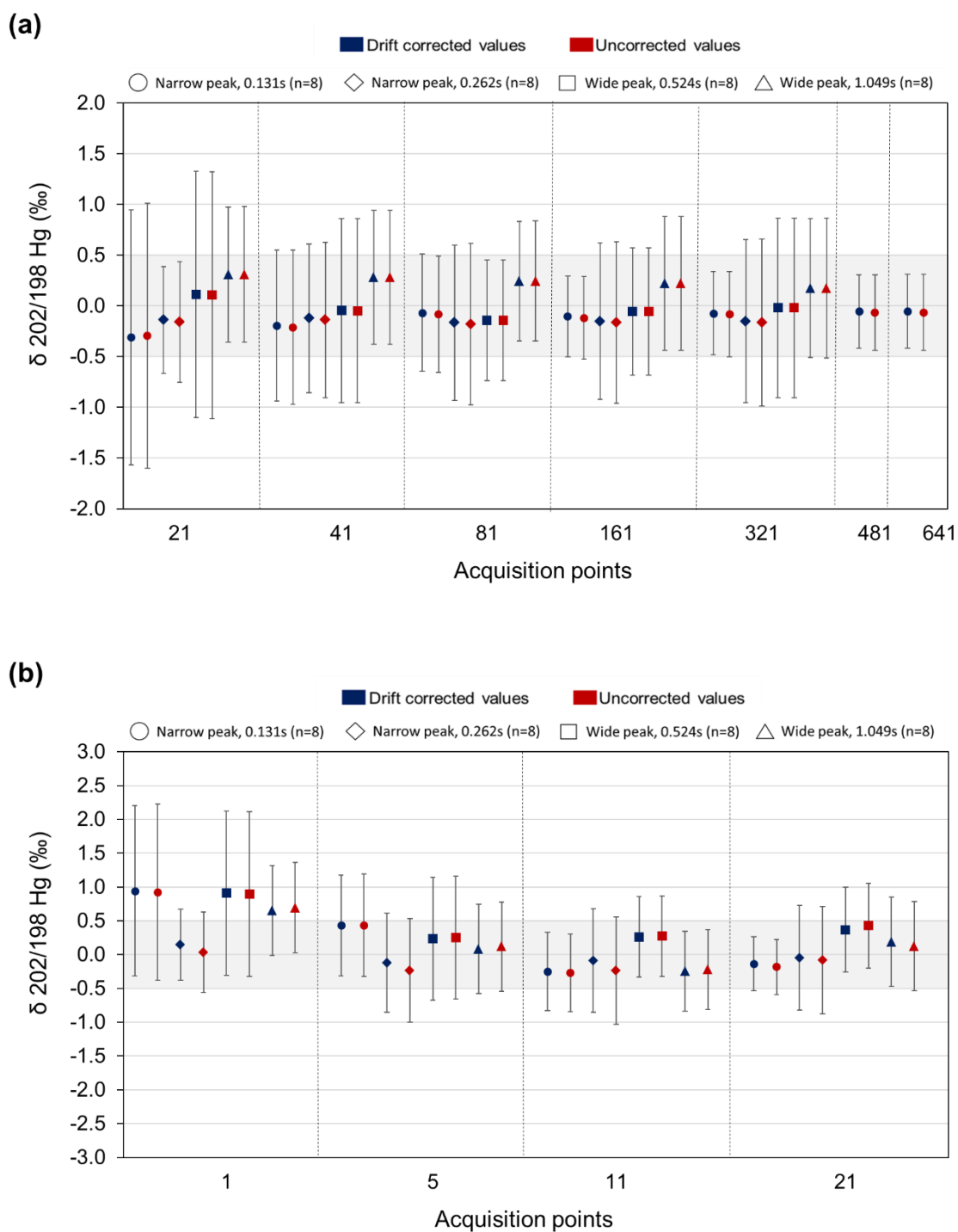


Figure S5. Influence of the time-lag correction of the Faraday cups in the external precision of $\delta^{202}\text{Hg(II)}$ when calculating the Hg(II)-specific isotope ratios by: (a) LRS and (b) PbP. Error bars represent the associated external precision ($\pm 2\text{SD}$) for $n=8$ independent measurements. An optimal external precision interval of $\pm 0.50\text{‰}$ based on previous studies (Epov *et al.*, 2010, 2008) is highlighted.



D.4. Desarrollo de una metodología para la medida exacta y precisa de relaciones isotópicas del C del CH₃Hg.

Artículo científico VI

Enviado a Journal of Chromatography A

Sensitive determination of methylmercury $\delta^{13}\text{C}$ compound specific stable isotopic analysis by purge and trap gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (PT-GC-C-IRMS)

Silvia Queipo-Abad, Christelle Lagane, David Point

D.4.1. Introducción

La toxicidad del mercurio depende directamente de su especiación. El metilmercurio (CH_3Hg) es la especie que presenta un mayor riesgo para la salud debido a sus características neurotóxicas unidas a su incorporación y bioacumulación en los organismos acuáticos. Tanto MeHg como dimetilmercurio [$(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$] se forman en el agua a partir del Hg(II) depositado, aunque sólo el MeHg tiene la propiedad de bioacumularse y biomagnificarse en la cadena trófica.^{53,68} Los seres humanos estamos expuestos al CH_3Hg , principalmente a través del consumo de pescado contaminado. A pesar de sus características y del gran interés que suscita a nivel científico, tanto su formación como las rutas que sigue el CH_3Hg en el medio ambiente aún son desconocidas. El estudio de la metilación en ecosistemas marinos costeros y en lagos, determinó que el origen era preferentemente la actividad biótica en la interfase agua-sedimento.^{54,55} Además, el hallazgo de los genes específicos de metilación HgcAB, demuestra que el origen bacteriano es una vía importante de producción.^{59,335} A raíz de esto, el número de compartimentos que pueden ser potenciales fuentes de metilación se ha ampliado.⁶¹ Sin embargo, existen otros parámetros que pueden condicionar el proceso. Por ejemplo, la presencia de materia orgánica a lo largo de la columna de agua facilita la metilación *in situ*.⁵⁶ Esta materia orgánica también parece jugar un papel importante en la transferencia de CH_3Hg a lo largo de la cadena trófica.⁷⁰ Estas nuevas perspectivas sugieren la existencia de otras rutas biogeoquímicas del CH_3Hg a nivel acuático, más allá de su producción biótica.

Hasta ahora los análisis de la composición isotópica de CH_3Hg , no implicaban necesariamente el empleo de un método de especiación, ya que se realizaba en muestras cuyo contenido mayoritario esperado era CH_3Hg .^{249,251} Recientemente Masbou *et al.* (2015)²⁸⁶ desarrollaron una metodología para la medida de la composición isotópica del C en el CH_3Hg . El acoplamiento de la cromatografía de gases a un sistema de IRMS, permite la obtención de valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$. Este tipo de análisis ha demostrado un gran potencial en el empleo del C como trazador de procesos biogeoquímicos.³³⁶ El estudio del fraccionamiento isotópico del átomo de C, incluido en el grupo metilo de CH_3Hg podría proporcionar valiosa información para comprender los fundamentos en los procesos de metilación de Hg. Las recomendaciones para

la medida exacta y precisa de las relaciones isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) en moléculas organometálicas sugieren una señal superior a 0.5 V.³³⁷ Para alcanzar esta sensibilidad se necesita una cantidad de analito, y por tanto una masa de muestra suficiente para llevar a cabo la medida. Estas condiciones de sensibilidad son altamente restrictivas en el caso del CH_3Hg en la mayoría de las muestras biológicas. Una alternativa instrumental sería un sistema de purga y trampa (PT), el cual permite purgar y acumular cuantitativamente un compuesto volátil en una trampa analítica, que posteriormente pasa por una etapa de desorción y análisis. Este procedimiento podría ayudar a disminuir los límites de detección,³³⁸ permitiendo separar los analitos volátiles de la matriz, eliminando el disolvente, y minimizando así la contribución del blanco de carbono.^{339–341} Debido a que esta metodología es novedosa no existen materiales o estándares de referencia de CH_3Hg con valores de $\delta^{13}\text{C}$. Por tanto, estos trabajos, pioneros en este campo, requerirán de iniciativas de validación que permitan obtener resultados fiables y de calidad en las medidas.

**A lo largo del presente Objetivo se cambiará la notación MeHg por CH_3Hg para destacar que la medida se realiza con el fin de obtener la composición isotópica del átomo de C, y a su vez diferenciarlo de los C incorporados a partir del reactivo derivatizante, que se denotarán por Et (etilo).

D.4.2. Objetivos

El objetivo de este Objetivo es el Desarrollo de una metodología para la medida exacta y precisa de relaciones isotópicas del C del CH₃Hg. Este objetivo principal se ha desarrollado a partir de los siguientes puntos:

- Optimización de los parámetros experimentales que garanticen una transferencia cuantitativa de los analitos a través del sistema PT-GC-IRMS mediante el empleo de compuestos orgánicos volátiles (BTEX) con puntos de ebullición similares a los compuestos de Hg etilados (CH₃HgEt y Hg₂Et).
 - Evaluación de la linealidad, a través de las áreas de pico, en la transferencia de compuestos orgánicos volátiles, los cuales no requieren un proceso *off-line* de derivatización, a diferentes niveles de concentración
 - Estudio del posible fraccionamiento isotópico de compuestos orgánicos volátiles a través del sistema PT-GC-IRMS.
 - Evaluación de la linealidad, a través de las áreas de pico, en la transferencia de las especies de Hg a través del sistema PT-GC-IRMS a diferentes niveles de concentración.
 - Validación del empleo de Hg(II) como estándar interno en la corrección de la contribución de C del reactivo derivatizante, en la determinación de relaciones isotópicas de ¹³C ($\delta^{13}\text{C}$) del CH₃Hg.
 - Obtención de un valor $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ de referencia para validar la metodología a través de una comparativa con los resultados de un trabajo previo por GC-C-IRMS con inyección líquida y evaluar la precisión en la determinación de la composición isotópica como 2SD.
-

D.4.3. Artículo Científico VI

Sensitive determination of methylmercury $\delta^{13}\text{C}$ compound specific stable isotopic analysis by purge and trap gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (PT-GC-C-IRMS)

Silvia Queipo-Abad¹, Christelle Lagane², David Point^{2*}

¹ Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006 – Oviedo (Spain)

² Observatoire Midi-Pyrénées, Géosciences Environnement Toulouse, UMR CNRS 5563/IRD 234/Université Paul Sabatier Toulouse 3, 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France

*Author for correspondence: david.point@ird.fr

ABSTRACT

Despite several decades of mercury research, answering fundamental questions on where and how methylmercury (CH_3Hg) is produced in aquatic ecosystems, is still highly challenging. Investigating complex and/or coupled processes in the context of global changes requires new high-resolution analytical tools. The purpose of the compound specific carbon stable isotopic analysis ($\delta^{13}\text{C}$ -CSIA) of the methyl group of methylmercury (CH_3Hg), is to explore how the carbon cycle contributes to CH_3Hg sources and formation pathways. The main problem associated with recent CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ -CSIA methods is the limited sensitivity when using Liquid Injection (LI)-GC-C-IRMS techniques, requiring several micrograms of CH_3Hg (as Hg). In this work, we present the development and application of an original Purge-&-Trap system (PT) coupled to a GC-C-IRMS with the purpose of transferring and analyzing the total amount of CH_3Hg available in a sample vial in the low nanogram range. The new PT-GC-C-IRMS system enhance the sensitivity by a factor better than 200, relative to LI-GC-C-IRMS, by minimizing the sample mass requirements. The $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values obtained, following the same sample derivatization approach coupled to PT-GC-C-IRMS ($-53.5 \pm 1.9 \text{ ‰}$), were in good agreement with the ones obtained in a previous study ($-53.8 \pm 1.1 \text{ ‰}$). The standard solution was prepared from the same salt, requesting only 25 to 200 ng of CH_3Hg (as Hg). This new methodology represents a milestone towards the analysis of large array of biological samples displaying CH_3Hg concentrations in the low-mid ng g^{-1} range, in order to explore the meaning of the carbon stable isotopic signature of CH_3Hg in the environment.

1. INTRODUCTION

Methylmercury (CH₃Hg) is considered the highest neurotoxic form of mercury due to its effects in the development of the nervous system [1]. Fish consumption is, currently, the main known source of CH₃Hg exposure in humans [2]. Mercury levels in fish are of public concern and some guidelines were adopted. In 2001, the European Union (Decision 466/2001/EC) set a maximum level of 0.5 µg Hg g⁻¹ (wet weight) [3]. The U.S. Food and Drug Agency adopted the concentration of 1 µg g⁻¹ for CH₃Hg, as the limit from which fish should not be consumed, due to its associated health risk [4]. The U.S. Environmental Protection Agency established a standard value for the daily CH₃Hg dose of 0.1 µg kg⁻¹ of body weight [5]. Once inorganic Hg is methylated, it is rapidly accumulated in the foodweb and biomagnified in the trophic chain [6]. Even though the concentrations of this compound have been widely studied in both marine and fresh aquatic ecosystems, processes governing how, where, and when it is formed prior to its incorporation in the food web remain still unclear [7]. Methylation can occur by both biotic and abiotic mechanisms in the water column [7–10]. In addition, the concentration increases with depth being more pronounced in the area close to the sediment compartment, with greater particulate and bacterial activity [11]. The recent discovery of methylation genes [12] has confirmed the consensual idea that the bacterial origin of CH₃Hg was likely one of the main production pathways. However, the presence of these genes may not be the most relevant factor in methylation. Invertebrate digestive tracts, permafrost soils or extreme environments, has been also revealed as potential methylation environments, suggesting multiple routes for CH₃Hg entry into food webs [13]. The presence of organic matter seems to increase CH₃Hg bioaccumulation in the trophic chain [14]. A recent work has found that the methylation mechanism is controlled by the presence of Hg-ligand binding [15]. So far, it is still difficult to precisely deconvolute the individual pathways governing CH₃Hg origin and production in complex ecosystems. New and more resolute analytical tools capable of providing new insights on CH₃Hg origin and fate are much needed.

The recent development of compound-specific stable isotope analysis of organometallic compounds has shed some light on the formation of this class of compounds and opens a new source of knowledge about tracing their environmental behavior [16]. The interest of carbon

isotope analysis to elucidate the fate of organometallic compounds, is shown in the large isotope fractionation observed due to the abiotic transformation of the transferred methyl group in the case of arsenic compounds [17]. The study of the carbon source and isotope fractionation of the C atom embedded in methyl group of CH₃Hg could provide new information to understand the fundamentals of Hg methylation processes, and CH₃Hg origin [18].

Gas chromatography coupled to Isotope Ratio Mass Spectrometry (GC-C-IRMS) has been revealed as a powerful technique to identify biogeochemical pathways for multiple organic analytes [19]. Recently, Masbou and coworkers [18] presented the first approach to determine carbon isotope ratios for CH₃Hg compound. The limiting factor for the application of these methodologies is the amount of CH₃Hg needed, and by extent the sample mass requested for analysis. The recommendations for the precise measurement of carbon isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$) on individual organometallic molecules require a signal higher than 0.5 V [20]. These sensitivity conditions are highly restrictive in the case of CH₃Hg which holds a single carbon atom and require a minimum injection of 100-300 ng of CH₃Hg (as Hg). In the case of liquid injection techniques, where only a μL fraction of solvent is injected per sample, and even after manual preconcentration under a nitrogen stream, this means extracting initially about 20 μg of CH₃Hg for each individual sample [18]. One of the instrumental possibilities to enhance the sensitivity is to maximize the preconcentration step of the analytes prior to its introduction in the GC column [21,22]. A Programmable Temperature Vaporizing (PTV) injector is designed to concentrate volatile analytes contained in a high volume of sample and corresponding solvent. However, the preconcentration is not only limited to the volatile analytes but also to the impurities with carbon content, thus increasing as well as the signal background in the case of GC-C-IRMS. Alternatively, a purge and trap (PT) approach which consisting of quantitatively purging and accumulating a volatile compound of interest present into a sample vial onto an analytical trap prior to its desorption and analysis could help to decrease the limits of detection [22]. This methodology allows to separate the volatile compounds of interested from its matrix, and to eliminate the need for a solvent, therefore minimizing the contribution of carbon blank. Zwank and coworkers demonstrated the power of the PT in reducing the initial amount of analyte required for the analysis [23]. The capability of PT method including a secondary cryofocussing step coupled to

GC-C-IRMS analysis, was previously demonstrated by Wuerfel and coworkers for carbon isotope fractionation studies in the case of arsenical compounds [17,24]. The efficiency of this purge and trap methodology was previously evaluated by Diaz-Bone and coworkers by GC-MS [25]. The other limiting factor associated with this type of analysis is the lack of existing reference standard solution, and beyond, true natural reference materials for which certified and/or published in house reference $\delta^{13}\text{C}$ values for organometallic standards, and in particular CH_3Hg are available.

The aim of this work was to (i) test and optimize a unique PT device equipped with a LN₂ cooled microtrap technology coupled with a GC-C-IRMS for the precise, quantitative and accurate determination of $\delta^{13}\text{C}$ for both Volatile Organic Compounds (VOC), and derivatized (ethylated) CH_3Hg present at low concentration levels in house CH_3Hg reference solutions, (ii) document the sensitivity improvement of the PT-GC-C-IRMS method relative to LI-GC-C-IRMS analysis for $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ determination [18], and (iii) to discuss the agreement and precision obtained by both methods when analyzing a standard solution prepared from the same CH_3Hg salt source.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Material and methods

The primary VOC standard solution used in this work consisted of a 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ Benzene, Ethylbenzene, Toluene, and (m, o, p) Xylenes (BTEX) compound mixture in Methanol (MeOH), purchased from Restek (Bellefonte, PA, USA). This standard solution was primarily diluted in MeOH, and a secondary standard of 200 ng g^{-1} in water, prepared on a daily basis was used. About 50 to 200 μL of this secondary BTEX standard solution was diluted into a final volume of 10 mL Milli-Q water in a 15 mL PT glass vials equipped with a silicon Teflon septum.

The primary CH_3Hg reference standard solution used in this study was prepared from a methylmercury chloride salt (Sigma-Aldrich; Milwaukee, WI, USA) dissolved in a 10% (v/v) methanol/water solution. This CH_3Hg salt source is identical to the employed in our previous study

[18] with an estimated $\delta^{13}\text{CCH}_3\text{Hg}$ value of -53.8 ± 1.1 ‰. An inorganic Hg standard solution (Hg(II)) NIST SRM 3133 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) was also employed in this work. Secondary CH_3Hg and Hg(II) standard solutions of approximately $1000 \text{ ng of Hg g}^{-1}$ each were prepared in 1% w/w bi-distilled HCl. About 25 to 200 μL of these standard solutions were added to 9 ml of MQ water into a 15mL PT glass vials equipped with a with silicone Teflon septa, and followed by the addition of 1 mL of pH4; 0.1M Citric acid- Sodium citrate buffer (salts purchased from Sigma-Aldrich; Milwaukee, WI, USA) [26]. These solutions were ethylated by adding 50 to 250 μL of NaBEt_4 0.1% (Merseburger Spezialchemikalien, Germany) to form CH_3HgEt and HgEt_2 compounds, respectively. The sodium (tetra-n-ethyl)borate salt (NaBEt_4) was diluted to 20% in Milli-Q, aliquoted in vials of 1 mL and stored in the freezer at -18°C until use. The solution was cleaned, before its dilution to 0.1%, by means of a liquid-liquid extraction with hexane and two subsequent dilutions in order to eliminate the traces of hexane in the reagent. This clean-up step allows to eliminate some organic interferences (See Supplementary material and Figure S.3). This procedure is performed just before the preparation of the solutions for analysis, with frozen stored aliquots of the reagent that should melt prior to the cleaning with hexane. All the glass labware, new and reused, employed in this work was cleaned by pyrolysis before use. Millipore $18.6 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ultrapure water and bi-distilled hydrochloric acid were used for the preparation of all solutions.

2.2. Instrumentation

The measurement of the $\delta^{13}\text{C}$ values for ethylated Hg(II) and CH_3Hg , and BTEX compounds was performed using a Gas Chromatograph (GC, Trace 1310, Thermo Scientific) equipped with a DB-5MS capillary column (Agilent J&W Scientific, 5% diphenyl, 95% dimethylsiloxane, $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.} \times 0,25 \mu\text{m}$), coupled to an Isotope Ratio Mass Spectrometer (MAT 253 IRMS, Thermo Scientific), using a GC Isolink combustion reactor and a Conflow IV (Thermo Scientific) interface. The GC-C-IRMS was interfaced with an automated Purge and Trap unit (VSP4000, IMT Innovative Messtechnik, Vohenstrauß, Germany) directly connected to the GC column by the mean of a heated transfer line. The PT unit was equipped with a Peltier water trap (PWT) to remove water vapors and a micro Tenax trap (cooled at -50°C by LN_2) was used

as a sorbent to trap volatile organic compounds. The GC conditions and the set-up of the PT unit are detailed in Table S.1 in the Supplementary material.

2.3. Measurement of carbon isotope ratios

The $\delta^{13}\text{C}$ values measured in this work are expressed relative to a high purity CO_2 reference gas which was previously calibrated by liquid injections of a $\delta^{13}\text{C}$ certified C15-C13-C20 alkane mix standard solution (Chiron, Norway). The $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios measured for each BTEX and ethylated $\text{Hg}(\text{II})$ and CH_3Hg compounds are normalized to the Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) reference standard and expressed in δ notation as shown in Equation 1.

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{sample}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} \right)_{\text{VPDB}}} - 1 \right) \times 1000 \text{ (‰)} \quad \text{Eq. 1}$$

Before each analytical session, IRMS linearity and stability tests were conducted as part of the daily maintenance checks.

Since $\delta^{13}\text{C}$ values can be determined for ethylated $\text{Hg}(\text{II})$ and CH_3Hg compounds, the estimation of the endogenous $\delta^{13}\text{C}$ values of the methyl group of CH_3Hg is estimated according to Equation 2 (see ref. [18] for details),

$$\delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3\text{Hg}) = \delta^{13}\text{C}(\text{CH}_3\text{HgEt}) \times 3 - \delta^{13}\text{C}(\text{HgEt}_2) \times 2 \quad \text{Eq. 2}$$

2.4. Experimental strategy for assigning reference $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values for trace amounts of CH_3Hg by PT-GC-C-IRMS.

In order to ensure accurate and traceable $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ measurements by PT-GC-C-IRMS analysis, a two steps approach was considered. Firstly, a diluted BTEX standard solution, was used to optimize the purging conditions to ensure a quantitative purging and trapping of each compound by the optimized PT method. BTEX act as a secondary standard for $\delta^{13}\text{C}$ analysis of

volatile compounds, that can be analyzed directly by PT-GC-C-IRMS, displaying boiling points in the range of ethylated Hg compounds. Secondly, we applied the validated purging conditions to Hg compounds with checking that peaks intensities for both CH₃HgEt and Et₂Hg normalized to their carbon contents was similar to that of BTEX compounds to ensure a quantitative derivatization and purging of ethylated Hg compounds in solution. Every five measurements of a solution of ethylated CH₃Hg and Hg(II), a solution of BTEX was introduced into the system with the aim of controlling the traceability and accuracy of the measurements. The optimized conditions were then used to assign reference $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ values to the CH₃Hg reference solution prepared in this study and traceable to the of our previous study [18]. All results were obtained by performing a partial oxidation of the combustion reactor (Seed Oxidation), between each run. The oxidation of the combustion reactor was performed on daily basis at the end of each analytical session.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Evaluation of the purging and trapping efficiencies of BTEX for $\delta^{13}\text{C}$ analysis by PT-GC-C-IRMS

The purging conditions were optimized to obtain the maximum purging and transfer yield of the VOC compounds from the solution to the analytical trap, and from the trap to the GC-C-IRMS. BTEX (Benzene, Toluene, Ethylbenzene and o,p,m-Xylene), were the organic compounds selected for this evaluation, due to the possibility of employing similar operating conditions as for Hg compounds (See Table S.1. in the Supplementary Material). Benzene was not analyzed due to its proximity in the elution to the peak of MeOH, which is the dilution media of the BTEX stock solution. These two early peaks were left out from the chromatograms by switching on the backflush valve position into straight mode after 200 s, in order to avoid saturation of the detector with carbon inputs. The consideration of the other four volatile organic compounds is sufficient for method validation.

An assay was performed to determine the purging time that gives the maximum intensity (peak areas per ng of C added to the solution) for each compound. The results are illustrated in Figure 1. The carbon content of each compound in the purging solution was set to about 15 ng of C (about 16 ng of each BTEX), which provide enough sensitivity for precise $\delta^{13}\text{C}$ CSIA measurements. The purging time varied from 5 to 20 min using a He purge flow of 20 ml min^{-1} . The desorption time of the tenax trap was set to 235°C during 30 s to achieve a complete transfer of BTEX compounds from the analytical trap to the GC-C-IRMS by the mean of the heated transfer line. Five replicates of each compound, with the corresponding purging time, were analyzed to obtain the uncertainty, expressed as 2SD. As the graphs show, the normalized peak area ($\text{V}\cdot\text{s}^{-1}/\text{ng of C}$), for each compound in the purging vial, increases proportionally up to 15 min of purge with no further improvements between 15 and 20 min. This suggests that the quantitative trapping of BTEX compounds is achieved after 15 minutes of purge. Thus, the purging time was set to 20 min using a He purge flow of 20 mL min^{-1} to achieve a quantitative transfer and trapping of the BTEX compounds prior to GC-C-IRMS analysis. The $\delta^{13}\text{C}$ values for BTEX were found unchanged during the different purging times, indicating the absence of fractionation artefact resulting from the incomplete purging, and thus transfer of BTEX from the liquid phase to the analytical trap prior to GC-C-IRMS analysis. The chromatograms illustrated in Figure 2.a. showed that three of the BTEX compounds were perfectly resolved, except for the m-Xylene and p-Xylene compounds, displaying nearly identical boiling points and coeluting at 403 s. This coelution is confirmed by the higher peak height relative to the three other compounds.

The linearity of the measurements was evaluated by analyzing four different concentration levels (10, 20, 30 and 40 ng of C) of the BTEX standard solution in Milli-Q water. The results are shown in Figure 3, showing that the peak areas of each individual compound increase linearly as a function of the amount of BTEX (ng of C) compounds in solution ($r^2=0.99$). These results indicate a quantitative purging, transfer and analysis of the different analytes, independent of its respective concentration in the solution. The numerical data for $\delta^{13}\text{C}$ values of BTEX are presented in Table S.2 in the Supplementary Material. The relative similar intensity for the four compounds, present at the same concentration in solution, suggests that there is no compound specific preferential purging, and that the purging and trapping conditions are efficient

for a wide range of volatile compounds. The quantitative purging conditions lead to consistent $\delta^{13}\text{C}$ values for each BTEX compounds over the concentration range investigated, evidencing the absence of fractionation bias by the PT device, and its coupling to the GC-C-IR-MS. As expected, $\delta^{13}\text{C}$ measurements precision increased with the concentration of BTEX in solution. Overall and across the BTEX concentration range analyzed (10-40 ng of C), the standard deviation from the average ranged from 0.08-0.47 ‰. (as $\pm 2\text{SD}$, $n=20$ replicates). The instrument specifications suggest a precision in the range of the instrument (0.25‰ as SD for $n=5$). This indicates that the coupling of the PT module to the GC-C-IRMS does not induce any significant additional analytical bias in the case of volatile compounds relative to classical liquid injection techniques. Our in house $\delta^{13}\text{C}$ values for the four BTEX compounds are summarized in Table 1. The reference values obtained for BTEX standards were -27.5 ± 0.4 ‰ for Toluene, -28.9 ± 0.5 ‰ for Ethylbenzene, -26.4 ± 0.3 ‰ for m,p-Xylene and -27.4 ± 0.4 ‰ for o-Xylene (uncertainties expressed as 2SD for $n=45$ measurements). The $\delta^{13}\text{C}$ reference values and sensitivity values estimated for the different BTEX compounds, are employed as quality control over time to ensure that the system is working properly among different analytical sessions, when analyzing Hg compounds.

3.2. Evaluation of the quantitative purging and transfer of ethylated CH_3Hg and Hg(II) to the GC-C-IRMS

We have compared the sensitivities obtained for ethylated Hg compounds and BTEX when expressed as ng of C added to the solution. The comparison was done for the optimized purge and trap conditions obtained for BTEX compounds. Figure S.2. of the Supplementary material, showed that the purge and trap of ethylated mercury compounds provides nearly identical sensitivity estimates ($0.19 \pm 0.02 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}/\text{ng}$ of C for $n=60$ replicates of CH_3HgEt) relative to those measured for BTEX ($0.18 \pm 0.02 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}/\text{ng}$ of C for $n=45$ replicates of Toluene). This indicates that there are no specific differences in the purge and transfer between derivatized Hg compounds and volatile compounds. Therefore, Hg compounds are quantitatively derivatized in solution, purged, and analyzed by PT GC-C-IRMS in the same way as BTEX.

The linearity for these measurements was evaluated by analyzing standards prepared at five concentration levels (25, 50, 100, 150 and 200 ng of Hg, corresponding to ng of C expressed in Table S.3 of the Supplementary Material for each ethylated compound) in Milli-Q, as described in the material and method section. The results showed in Figure 4, correspond to 11 independent replicates for each level of concentration, except in the case of 25 ng with only 8 replicates. The linearity curves expressed as peak areas vs. ng of ethylated Hg compound present a regression coefficient (r^2) better than 0.99. These results suggest a quantitative transfer of the analytes and the absence of isotopic fractionation, independent of its amount in the solution.

The numerical data for $\delta^{13}\text{C}$ measurements is presented in the Table S.3 of the Supplementary material. The average values range from -29.6 to -30.6 and -38.0 to -38.4 ‰ for $\delta^{13}\text{C}_{\text{HgEt}_2}$ and $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{HgEt}}$ respectively. Overall, the estimated values for CH_3Hg $\delta^{13}\text{C}$ range from -53.6 to -54.8 for this assay, which is within the uncertainty range previously measured for the same MeHg salt source [18]. The chromatogram for CH_3Hg and Hg(II) is represented in Figure 2.b. The stability of the mercury compounds ethylated in aqueous solution has been demonstrated along the measurements performed in this work (Figure S.1. of the Supplementary material). The uncertainty ($\pm 2\text{SD}$) associated with $\delta^{13}\text{C}$ measurements range from 3.5 to 5.5 and 2.6 to 3.3 ‰ for HgEt_2 and CH_3HgEt respectively. This uncertainty is significantly higher than the uncertainty observed for BTEX compounds, despite covering a similar concentration range (0-50 ng of C). The higher uncertainties for ethylated Hg compounds may be associated to the fact that the analysis of these compounds involves an additional derivatization step prior to purging, relative to BTEX. Thus, this variability could be associated with the derivatization conditions. However, we found that despite Hg(II) acts as an internal standard capable of correcting the additional C atom, originating from NaBEt_4 , it also minimize the uncertainties associated with the derivatization step to estimate $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$. It is observed that the measurement precision ($\pm 2\text{SD}$) associated with the estimated $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ value, range from 1.0 to 2.7, which is much lower than the determined for ethylated CH_3Hg and Hg(II) compounds (Figure 4.a. for ethylated CH_3Hg and 4.b. for ethylated Hg(II)).

3.3. Evaluation of different derivatization conditions to minimize $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ uncertainty.

The most common way of derivatizing Hg compounds is the alkylation through alkylborate reagents. In this type of analyses, it is preferable to use of the minimum amount of reagent to limit the carbon blank contribution, associated with the reagents. Because of that, we have first estimated that the concentration of 0.1% of NaBEt_4 in Milli-Q was enough to accomplish a quantitative derivatization of the analytes. The assay was performed for a solution of Hg compounds of 100 ng of Hg (20 and 24 ng of C for CH_3Hg and Hg(II) respectively when ethylated). The drawback of this reaction is the addition of carbon atoms to the molecule with the consequent impossibility of the direct measurement of the $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ value. For this reason, and as specified before [18], we also used Hg(II) as an internal standard to correct for the $\delta^{13}\text{C}$ value of the exogeneous alkyl group contribution coming from the reagent (see Eq. 2). Previous work showed that the amount of the derivatization reagent is known to be responsible for the reduction and transformation of Hg compounds when derivatized Hg species are extracted into an organic solvent prior to GC-ICP-MS analysis [27]. Our results suggest that this is not the case when considering PT approaches, in the absence of solvent during the derivatization reaction since both the peaks intensities for both CH_3HgEt and HgEt_2 and their respective $\delta^{13}\text{C}$ values were nearly identical across a wide range of derivatizing agent amounts covering between 50 and 250 μL (Figure 5). This also suggests that the derivatization reaction does not induce significant fractionation artefacts in the range of the amount of NaBEt_4 added. However, in this assay we observed that for higher amounts than 100 μL of NaBEt_4 (0.1%), the precision of the $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ was much lower than the precision reached when using the lowest amount of NaBEt_4 (50 μL).

The $\delta^{13}\text{C}$ values obtained for 60 independent replicates of Hg compounds are detailed in Table 1, with an estimated $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ value of $-53.5 \pm 1.9 \text{‰}$. The results were compared with the values obtained in a previous approach by liquid injection of the same Hg compounds analytes in hexane [18]. The summary of all the results, obtained for different concentrations and different volumes of NaBEt_4 , are in agreement ($-53.8 \pm 1.1 \text{‰}$) with the value obtained previously for the same CH_3Hg source material. The comparison of these results allows us to conclude that the

methodology employed here does not fractionate Hg compounds, giving rise to accurate and precise $\delta^{13}\text{C}$ values of CH_3Hg .

3.4. Sensitivity improvement of the PT-GC-C-IRMS method relative to LI-GC-C-IRMS

The method performance of the new PT-GC-C-IRMS approach developed in this study is compared in Table 2 to the results obtained previously by LI-GC-C-IRMS, with analyzing a reference solution prepared from the same CH_3Hg salt source as in our previous study [18]. Both methods provide $\delta^{13}\text{C}$ values of the methyl group of CH_3Hg in good agreement and exhibit similar precision (2SD of 1.9 and 1.3 ‰, respectively). This is consistent with the fact that for both approaches, the same final amount of CH_3Hg is injected in the GC-C-IRMS. However, these results clearly show the higher efficiency and sensitivity of the PT approach over the LI method, requiring about 200 times lower initial amounts of CH_3Hg to finally inject the same quantity (25-200 ng) in the GC-C-IRMS. This achievement represents a milestone, indicating that PT-GC-C-IRMS is likely the method of choice towards analyzing different types of natural biological materials exhibiting CH_3Hg concentrations in the low-mid ng g^{-1} range such as invertebrates, mollusks, fish, and birds. These taxa represent the majority of the fauna in continental and marine ecosystems, and thus the resource of samples that can be used to document CH_3Hg carbon isotopic fractionation in the environment.

4. CONCLUSION

This work demonstrates the application of a Purge & Trap system coupled to a GC-C-IRMS to measure carbon isotope ratios of CH_3Hg . The simultaneous measurement of Hg(II) , as internal standard, also allows to the correction of the carbon contribution of the derivatization reagent, as well as improving measurement precision. The comparison of the $\delta^{13}\text{C}$ values obtained for the same “*in house*” standard solution in this study with a previous work, demonstrates also that the PT system does not fractionate the $\delta^{13}\text{C}$ values of the ethylated mercury compounds. A 200-fold improvement in sensitivity was achieved by PT-GC-C-IRMS compared to LI-GC-C-IRMS. The employment of BTEX as a secondary quality control standard along the measurements allow us

to verify the efficiency of the transfer of the Hg analytes. Therefore, the methodology developed here could provide precise and accurate information to explore and understand the meaning of the carbon signature of CH₃Hg.

ACKNOWLEDGMENTS

S. Queipo-Abad acknowledges MINECO for the provision of the Mobility Grant EEBB-I-17-11937 corresponding to the Predoctoral Grant BES-2013-062959. Funding was provided from IRD internal funding, and from ANR-17-CE34-0010, MERTOX from the French Agence Nationale de la Recherche.

REFERENCES

- [1] T. Takeuchi, N. Morikawa, H. Matsumoto, Y. Shiraishi, A Pathological Study of Minamata Disease in Japan, *Acta Neuropathol.* 2 (1962) 40–57. doi:10.1007/BF00685743.
- [2] M.A. Bradley, B.D. Barst, N. Basu, A review of mercury bioavailability in humans and fish, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 14 (2017). doi:10.3390/ijerph14020169.
- [3] European Union, Commission Regulation (EC) No 466/2001 of 8 March 2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, *Off. J. Eur. Union.* (2001) 25.
- [4] Food and Drug Administration, Chemical Contaminants and Pesticides - Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed, (2000) 1–11.
- [5] U.S. Environmental Protection Agency, A Review of the reference dose and reference concentration processes, 2002.
- [6] R.P. Mason, J.R. Reinfelder, F.M.M. Morel, Bioaccumulation of mercury and methylmercury, *Water, Air, Soil Pollut.* 80 (1995) 915–921. doi:10.1007/BF01189744.
- [7] R.P. Mason, The Methylation of Metals and Metalloids in Aquatic Systems, in: *Methylation-From DNA, RNA Histones to Dis. Treat.*, Intech, 2013: pp. 271–301.
- [8] W.F. Fitzgerald, C.H. Lamborg, C.R. Hammerschmidt, Marine Biogeochemical Cycling of Mercury, *Chem. Rev.* 107 (2007) 641–662. doi:10.1021/cr050353m.

- [9] E. Kaschak, B. Knopf, J.H. Petersen, N.H. Bings, H. König, Biotic methylation of mercury by intestinal and sulfate-reducing bacteria and their potential role in mercury accumulation in the tissue of the soil-living *Eisenia foetida*, *Soil Biol. Biochem.* 69 (2013) 1–10. doi:10.1016/j.soilbio.2013.11.004.
- [10] J.H. Weber, Review of possible paths for abiotic methylation of mercury(II) in the aquatic environment, *Chemosphere.* 26 (1993) 2063–2077. doi:10.1016/0045-6535(93)90032-Z.
- [11] E.M. Sunderland, D.P. Krabbenhoft, J.W. Moreau, S.A. Strode, W.M. Landing, Mercury sources, distribution, and bioavailability in the North Pacific Ocean: Insights from data and models, *Global Biogeochem. Cycles.* 23 (2009) 1–14. doi:10.1029/2008GB003425.
- [12] J.M. Parks, Johs Alexander, M. Podar, R. Bridou, R.A. Hurt, S.D. Smith, S.J. Tomanicek, Y. Qian, S.D. Brown, C.C. Brandt, A. V. Palumbo, J.C. Smith, J.D. Wall, D.A. Elias, L. Liang, The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation, *Science* (80-.). 339 (2013) 1332–1335. doi:10.1038/220173a0.
- [13] M. Podar, C.C. Gilmour, C.C. Brandt, A. Soren, S.D. Brown, B.R. Crable, A. V. Palumbo, A.C. Somenahally, D.A. Elias, Global prevalence and distribution of genes and microorganisms involved in mercury methylation, *Biochemistry.* 9 (2015) 1–13. doi:10.1126/sciadv.1500675.
- [14] S. Jonsson, A. Andersson, M.B. Nilsson, U. Skyllberg, E. Lundberg, J.K. Schaefer, S. Åkerblom, E. Björn, Terrestrial discharges mediate trophic shifts and enhance methylmercury accumulation in estuarine biota, *Sci. Adv.* 3 (2017) 1–9. doi:10.1126/sciadv.1601239.
- [15] K.M. Munson, C.H. Lamborg, R.M. Boiteau, M.A. Saito, Dynamic mercury methylation and demethylation in oligotrophic marine water, *Biogeosciences.* 15 (2018) 6451–6460. doi:https://doi.org/10.5194/bg-15-6451-2018.
- [16] M. Elsner, CRITICAL REVIEW www.rsc.org/jem | Journal of Environmental Monitoring Stable isotope fractionation to investigate natural transformation mechanisms of organic contaminants: principles, prospects and limitations, *J. Environ. Monit.* 12 (2010) 2005–2031. doi:10.1039/c0em00277a.
- [17] O. Wuerfel, M. Greule, F. Keppler, M.A. Jochmann, T.C. Schmidt, Position-specific isotope analysis of the methyl group carbon in methylcobalamin for the investigation of biomethylation processes., *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 2833–2841. doi:10.1007/s00216-012-6635-x.
- [18] J. Masbou, D. Point, G. Guillou, J.E. Sonke, B. Lebreton, P. Richard, Carbon Stable Isotope Analysis of Methylmercury Toxin in Biological Materials by Gas Chromatography Isotope Ratio Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 87 (2015) 11732–11738. doi:10.1021/acs.analchem.5b02918.

- [19] J.M. Hayes, K.H. Freeman, B.N. Popp, C.H. Hoham, Compound-specific isotopic analyses: A novel tool for reconstruction of ancient biogeochemical processes, *Org. Geochem.* 16 (1990) 1115–1128. doi:10.1016/0146-6380(90)90147-R.
- [20] B. Sherwood-Lollar, S.K. Hirschorn, M.M.G. Chartrand, G. Lacrampe-Couloume, An Approach for Assessing Total Instrumental Uncertainty in Compound-Specific Carbon Isotope Analysis: Implications for Environmental Remediation Studies, *Anal. Chem.* 79 (2007) 3469–3475. doi:10.1021/ac062299v.
- [21] J. Palau, A. Soler, P. Teixidor, R. Aravena, Compound-specific carbon isotope analysis of volatile organic compounds in water using solid-phase microextraction, *J. Chromatogr. A.* 1163 (2007) 260–268. doi:10.1016/j.chroma.2007.06.050.
- [22] A.H. Meyer, M.P. Maier, M. Elsner, Protocol to Investigate Volatile Aromatic Hydrocarbon Degradation with Purge and Trap Coupled to a Gas Chromatograph / Isotope Ratio Mass Spectrometer, in: *Hydrocarb. Lipid Microbiol. Protoc.*, 2015: pp. 259–288. doi:10.1007/8623_2015_174.
- [23] L. Zwank, M. Berg, T.C. Schmidt, S.B. Haderlein, Compound-Specific Carbon Isotope Analysis of Volatile Organic Compounds in the Low-Microgram per Liter Range, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5575–5583. doi:10.1021/ac034230i.
- [24] O. Wuerfel, R.A. Diaz-bone, M. Stephan, M.A. Jochmann, Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Isotopic Ratios of Biogenic Organometal(loid) Compounds in Complex Matrixes, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4312–4319. doi:10.1021/ac8027307.
- [25] R.A. Diaz-Bone, M. Hitzke, Multi-element organometal(loid) speciation by hydride generation-GC-ICP-MS: Overcoming the problem of species-specific optima by using a pH-gradient during derivatisation, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 861–870. doi:10.1039/b715243d.
- [26] T. De Smaele, L. Moens, R. Dams, P. Sandra, J. Van Der Eycken, J. Vandyck, Sodium tetra(n-propyl)borate: a novel aqueous in situ derivatization reagent for the simultaneous determination of organomercury, -lead and -tin compounds with capillary gas chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 793 (1998) 99–106. doi:10.1016/S0021-9673(97)00886-8.
- [27] S. Queipo-Abad, P. Rodríguez-González, W.C. Davis, J.I. García Alonso, Development of a Common Procedure for the Determination of Methylmercury, Ethylmercury, and Inorganic Mercury in Human Whole Blood, Hair, and Urine by Triple Spike Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 89 (2017) 6731–6739. doi:10.1021/acs.analchem.7b00966.

TABLES

Table 1. “In-house” reference $\delta^{13}\text{C}$ values for BTEX and ethylated mercury compounds (CH_3HgEt and HgEt_2) and corrected $\delta^{13}\text{C}$ for CH_3Hg (isotope ratios in ‰ with uncertainties expressed as 2SD from the average of the N corresponding replicates).

$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Toluene	Ethylbenzene	p,m-Xylene	o-Xylene	CH_3HgEt	HgEt_2	CH_3Hg	$\text{CH}_3\text{Hg}^{[18]}$
N	45	45	45	45	71	71	71	32
Average	-27.5	-28.9	-26.4	-27.4	-38.6	-31.1	-53.5	-53.8
2SD	0.4	0.5	0.3	0.4	2.6	4.2	1.9	1.1

Table 2. Method performance of the PT-GC-C-IRMS method relative to classical LI-GC--IRMS for the determination of the $\delta^{13}\text{C}$ value of the methyl group of CH_3Hg on the same reference standard solution.

Reference	Preparation and injection Methods	Derivatization Technique	Initial amount of CH_3Hg (ng, as Hg)	Solvent Vol., (Inj. Vol.)	Amount of CH_3Hg injected (ng, as Hg)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ (‰ \pm 2SD)
Masbou <i>et al.</i> , 2015 ^[18]	Liq.-Liq. Extraction, Liq. Inj. GC-C-IRMS	Ethylation	5000-80000	0.5mL (1 μ L)	10-110	-55.1 \pm 0.9 (-53.8 \pm 1.1*)
This Study	In vial purging, PT-GC-C-IRMS	Ethylation	25-200	-	25-200	-53.5 \pm 1.9

*Consensus mean obtained by 3 independent methods (See ref. [18] for details)

FIGURES

Figure 1. Variation of peak areas per ng of C ($\pm 2SD$) added and $\delta^{13}C$ values ($\% \pm 2SD$) for $n=5$ replicates for each different purging time of the solution from 5 to 20 min, for: a) Toluene; b) Ethylbenzene; c) m,p-Xylene and d) o-Xylene.

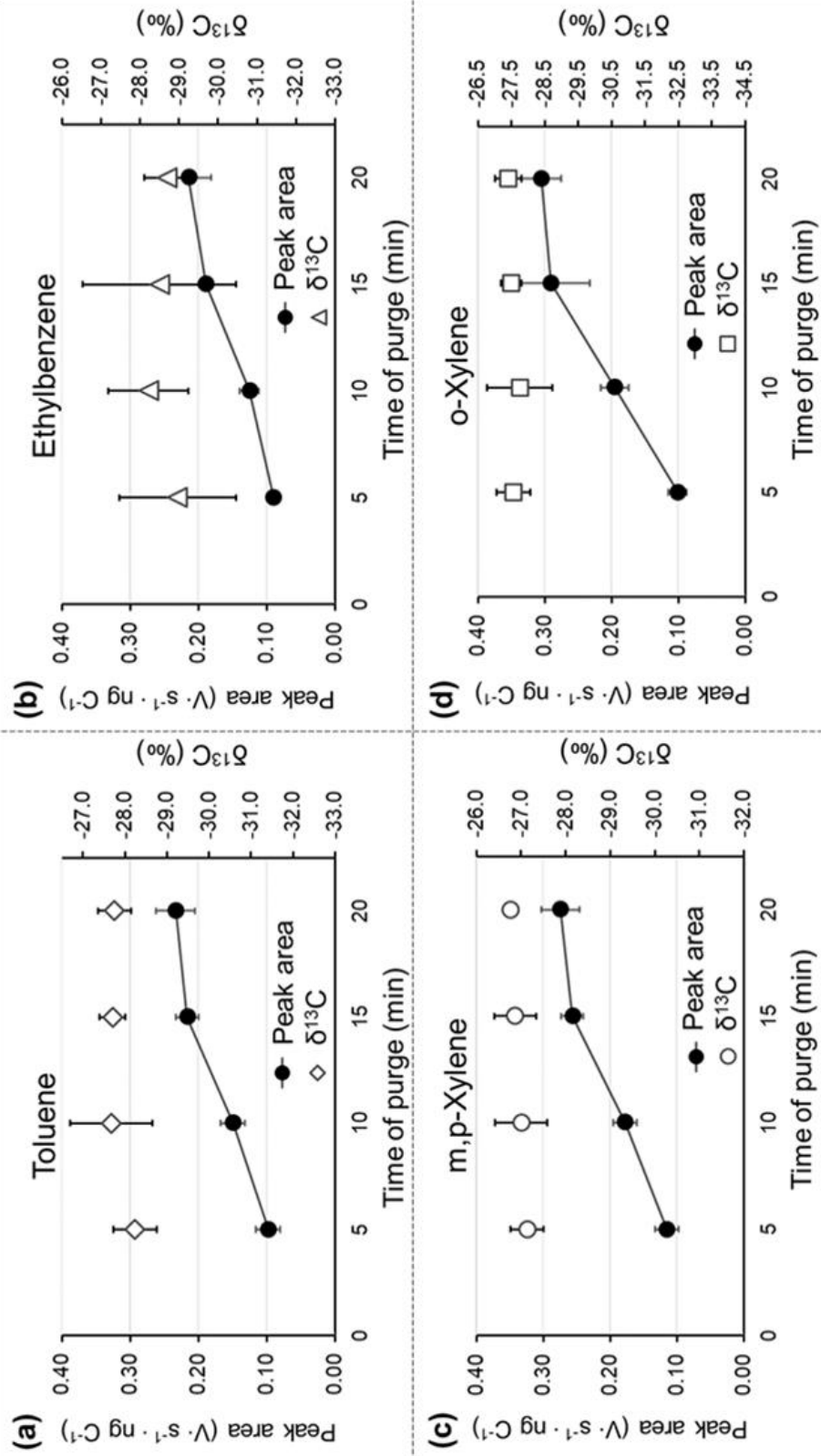


Figure 2. Chromatogram obtained for: (a) purged BTEX solution of 15 ng of C (about 16 ng of each compound in Milli-Q water) added to the solution for the best conditions assayed; (b) purged solution of 100 ng of CH₃Hg and Hg(II) (20 and 24 ng of C respectively).

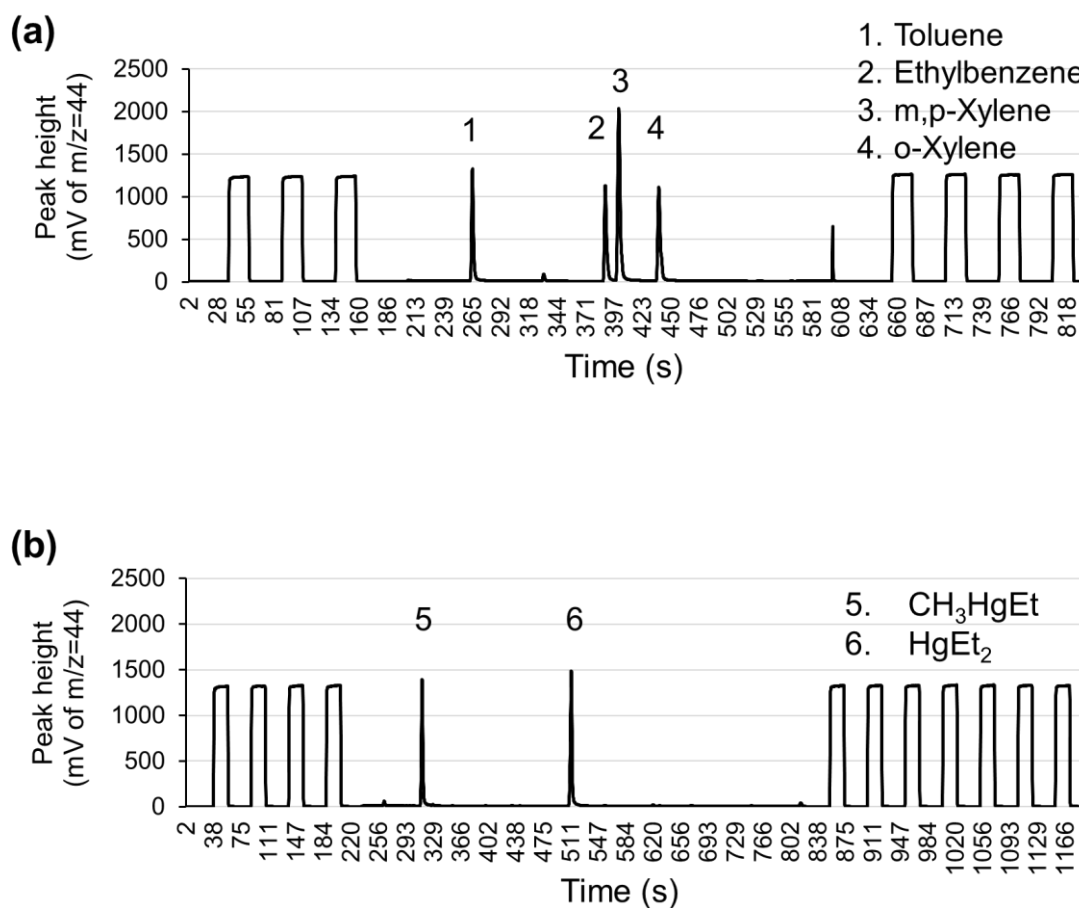


Figure 3. Linearity curves for BTEX (Peak area vs ng of compound) and $\delta^{13}\text{C}$ values for different concentrations in solution: a) Toluene; b) Ethylbenzene; c) m,p-Xylene and d) o-Xylene. The uncertainties are expressed as $\pm 2\text{SD}$ from five independent replicates.

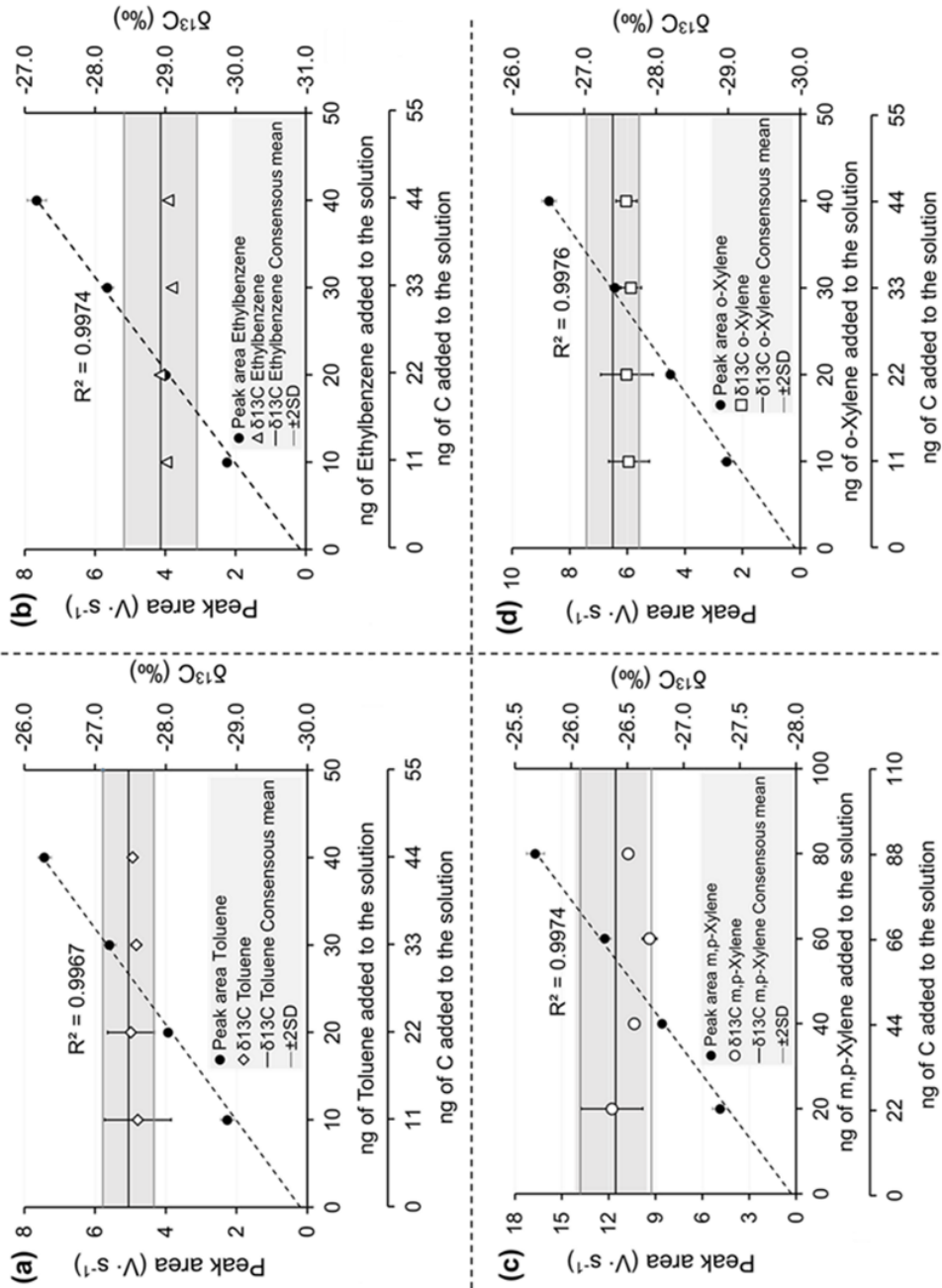


Figure 4. Linearity curves for ethylated CH_3Hg and $\text{Hg}(\text{II})$ (Peak area vs. ng of compound (ng of C)) and $\delta^{13}\text{C}$ values for different concentrations in solution: a) Ethylated CH_3Hg (CH_3HgEt) and CH_3Hg estimated $\delta^{13}\text{C}$ values; b) Ethylated $\text{Hg}(\text{II})$. The uncertainties are expressed as $\pm 2\text{SD}$ from 11 independent replicates in each level of concentration, except for 25 ng of C level with 8 replicates.

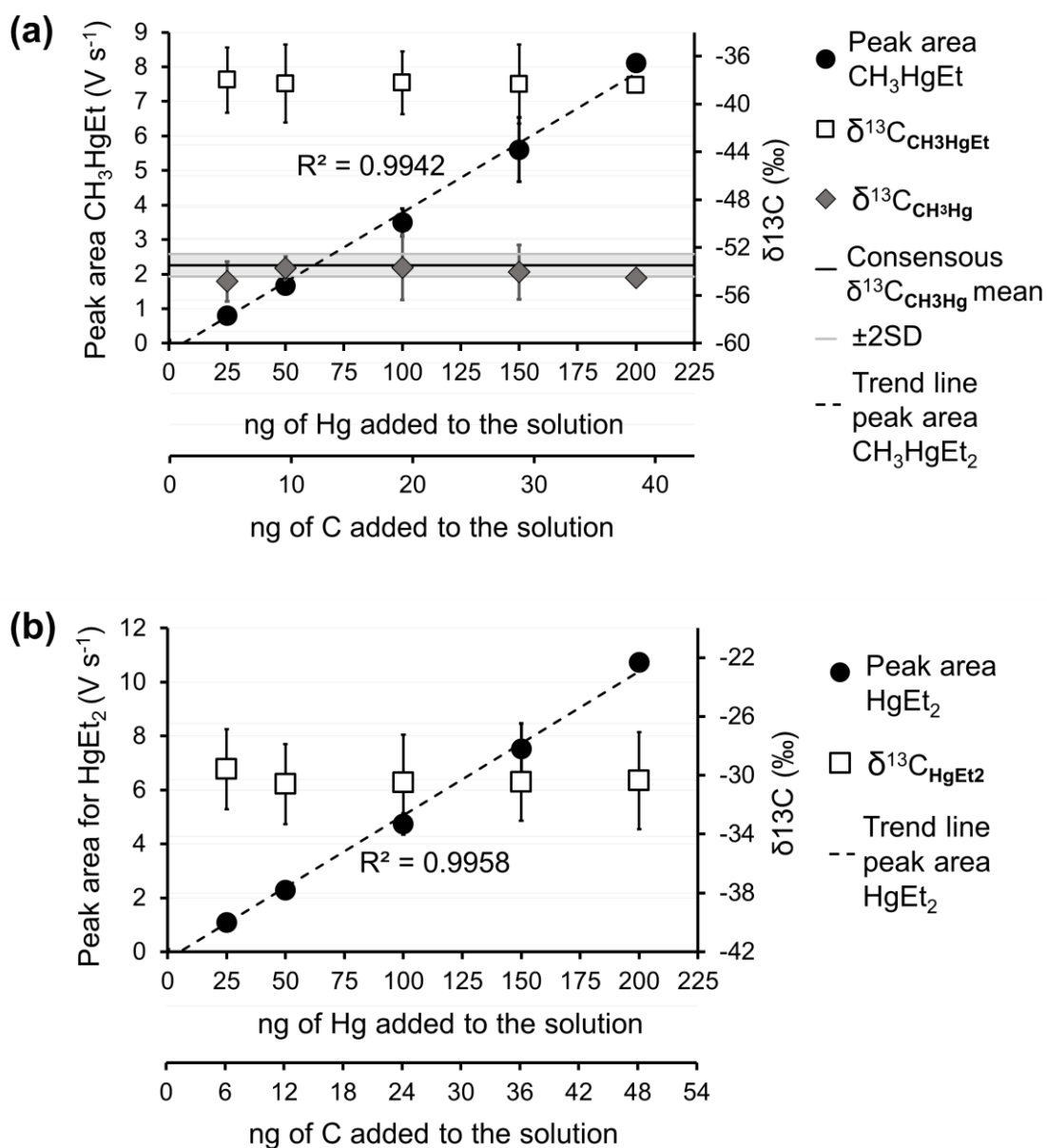
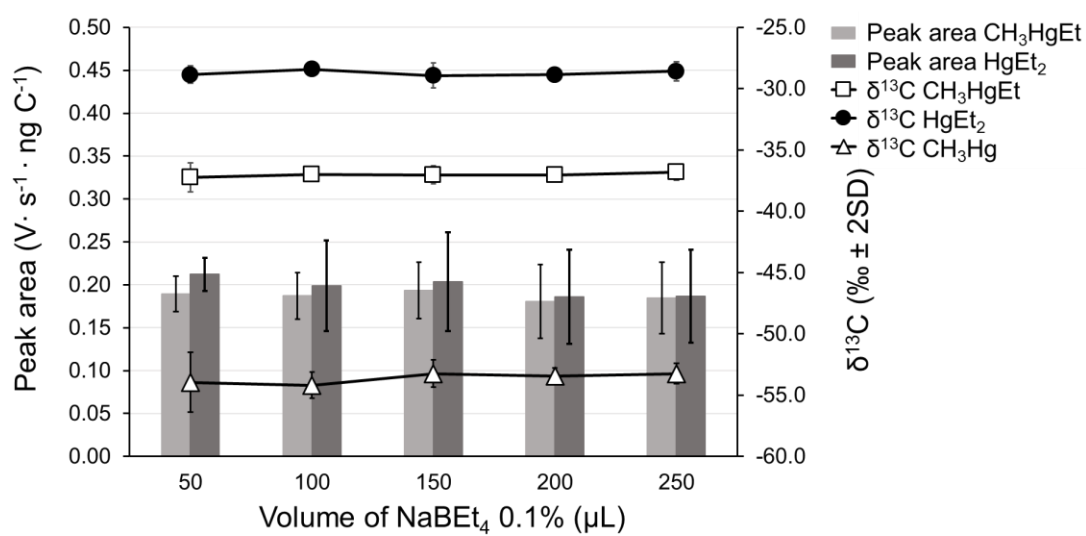


Figure 5. Evaluation of the volume of derivatization reagent (NaBEt₄ 0.1%) for the reaction with 100 ng of CH₃Hg and Hg(II), in order to obtain the best peak areas per ng of C added and the more reproducible δ¹³C values. The uncertainties are expressed as ± 2SD from five independent replicates in each level of concentration.



SUPPLEMENTARY MATERIAL

Sensitive determination of methylmercury $\delta^{13}\text{C}$ compound specific stable isotopic analysis by purge and trap gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry (PT-GC-C-IRMS)

Silvia Queipo-Abad¹, Christelle Lagane², David Point^{2*}

¹ *Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006 – Oviedo (Spain)*

² *Observatoire Midi-Pyrénées, Géosciences Environnement Toulouse, UMR CNRS 5563/IRD 234/Université Paul Sabatier Toulouse 3, 14 avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France*

*Author for correspondence: david.point@ird.fr

Table S.1. Operating parameters for the PT-GC-C-IRMS set up.

Purge-&-trap system	VSP-4000
He pressure	1500 mbar
Purging flow (mL min ⁻¹)	20
Purging time (min)	20
Sample T (°C)	40
Water trap T (°C)	-15
Trap T: Purging	-50
Trap T: Desorption	235
Desorption t (min)	2
Transfer line T (°C)	200
Gas chromatograph	Trace GC Ultra-Isolink GC (Thermo Scientific)
Column	Agilent DB-5MS (30m, 0.25mm I.D., 0.25µm)
Initial temperature	40°C (1 min)
Ramp rate 1	70-100°C to 5°C min ⁻¹ (CH ₃ Hg/Hg(II) standards) 40-80°C to 5°C min ⁻¹ (BTEX standards)
Ramp rate 2	50°C min ⁻¹
Final temperature	250°C (1 min)
Acquisition time	20 min

Table S.2. $\delta^{13}\text{C}$ values for BTEX under different concentration levels in the purged solution from 10 to 20 ng of C (isotope ratios in ‰ with uncertainties expressed as 2SD from the average of the N corresponding replicates).

N	ng C	ng of each BTEX	$\delta^{13}\text{C}_{\text{Toluene}}$		$\delta^{13}\text{C}_{\text{Ethylbenzene}}$		$\delta^{13}\text{C}_{\text{m,p-Xylene}}$		$\delta^{13}\text{C}_{\text{o-Xylene}}$	
			Average	2SD	Average	2SD	Average	2SD	Average	2SD
5	10	~11	-27.607	0.472	-29.012	0.013	-26.363	0.273	-27.623	0.281
5	20	~22	-27.508	0.331	-28.924	0.008	-26.564	0.024	-27.593	0.362
5	30	~33	-27.583	0.070	-29.092	0.070	-26.696	0.064	-27.653	0.140
5	40	~44	-27.532	0.054	-29.041	0.033	-26.510	0.044	-27.588	0.146

Table S.3. $\delta^{13}\text{C}$ values for ethylated mercury compounds (CH_3HgEt and HgEt_2) and corrected $\delta^{13}\text{C}$ for CH_3Hg under different concentration levels in the purged solution from 10 to 20 ng of C (isotope ratios in ‰ with uncertainties expressed as $\pm 2\text{SD}$ from the average of the N corresponding replicates).

N	ng Hg	ng C (CH_3HgEt)	ng C (HgEt_2)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{HgEt}_2}$		$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{HgEt}}$		$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$	
				Average	2SD	Average	2SD	Average	2SD
8	25	4.8	6.0	-29.580	3.475	-37.993	2.721	-54.817	2.434
11	50	9.6	12.0	-30.591	4.293	-38.296	2.725	-53.706	1.658
11	100	19.2	24.0	-30.487	5.539	-38.207	3.265	-53.648	0.998
11	150	28.8	36.0	-30.468	5.113	-38.325	2.631	-54.039	2.714
11	200	38.4	48.0	-30.363	5.512	-38.411	3.288	-54.505	2.272

Figure S.1. Sensitivity obtained as peak areas per ng of C added, for the four BTEX compounds compared to the derivatised CH₃HgEt and HgEt₂. Error bars represent the uncertainty expressed as ±1SD.

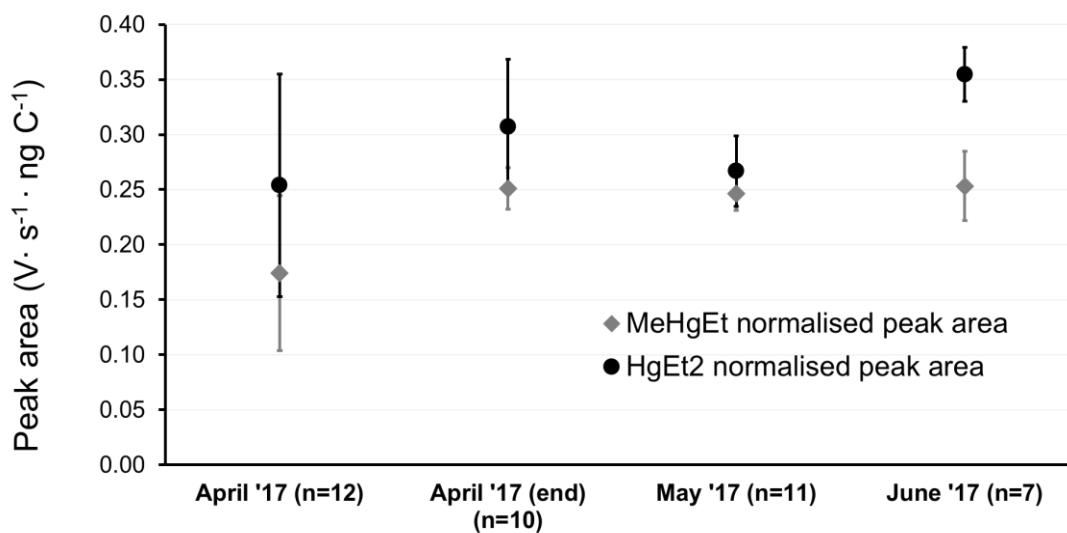
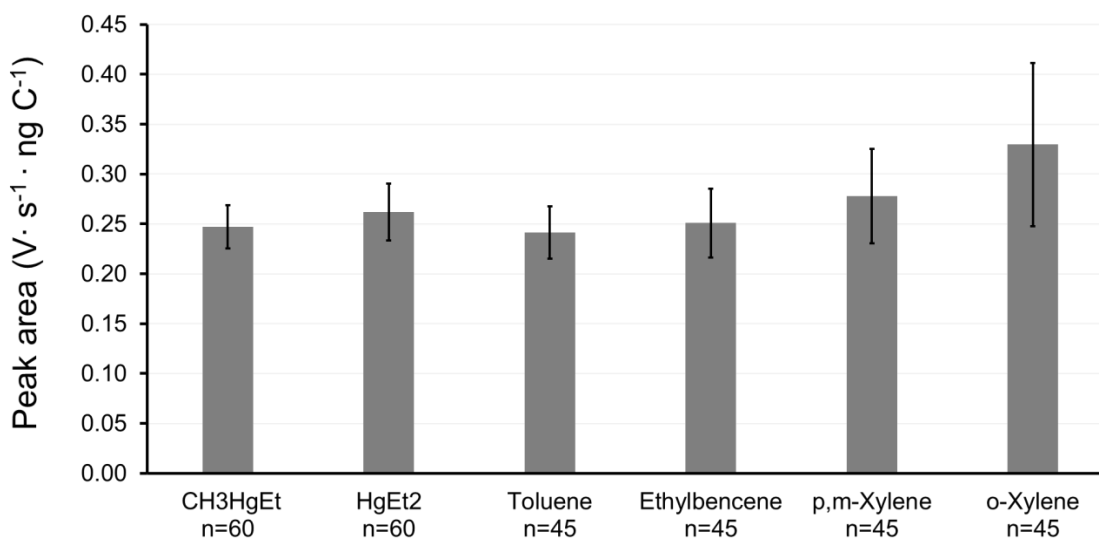


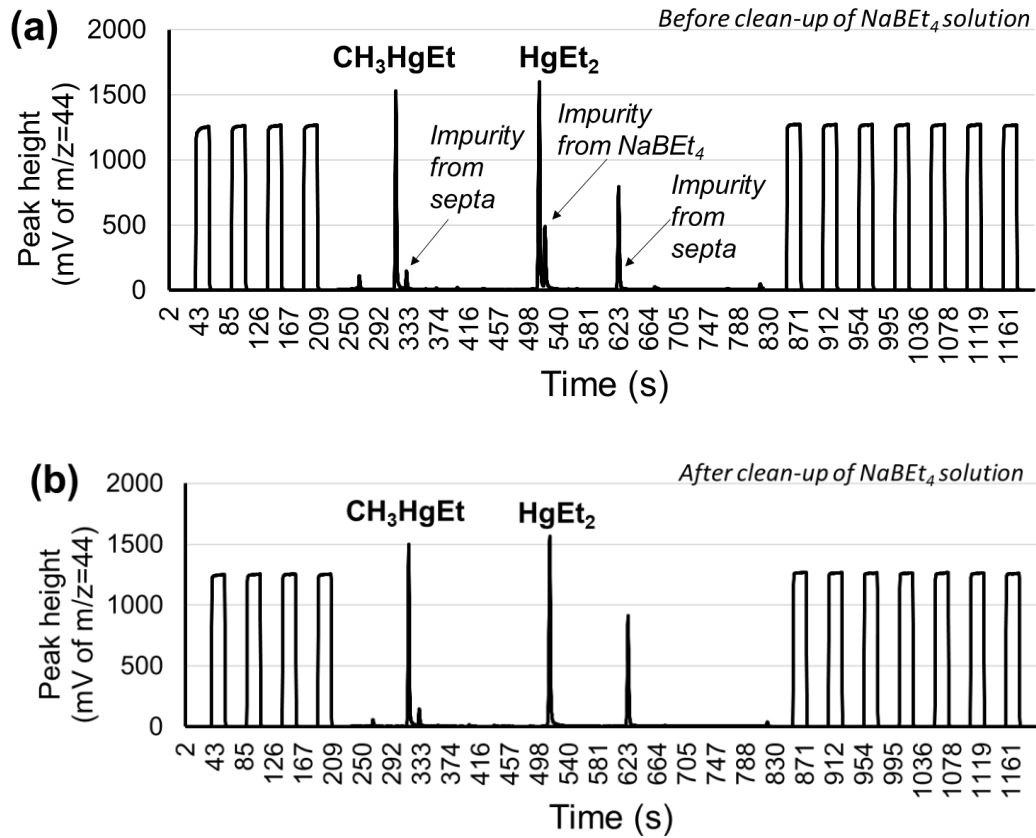
Figure S.2. Sensitivity obtained as peak areas per ng of C added (± 1SD) for the four BTEX compounds compared to the derivatised CH₃HgEt and HgEt₂.



Minimizing carbon impurities when using derivatization reagents.

Alkylation reactions were demonstrated as the best derivatisation procedure with the higher efficiency for CH_3Hg and Hg compounds [18] compared for example with halogenation. The drawback is that we may introduce impurities in the solution coming from the reagent that is often not highly pure (>96% in general). First, we needed to evaluate the possibility of performing a clean-up step for the reagent solution. Figure S.3. showed the typical chromatograms for the two Hg compounds with a concentration of 100 ng of Hg. The first chromatogram (Figure S.3.a.) showed three unknown species, two of them possibly interfering directly with the two mercury peaks. We observed a peak very closed to the Hg(II) peak that disappears in the second chromatogram (Figure S.3.b). This second chromatogram corresponds to the ethylated mercury species after carrying out a clean-up procedure of the derivatisation reagent. This procedure consists of the cleaning of the derivatisation reagent with hexane prior to its use. The clean-up consists of a liquid-liquid extraction from the reagent solution in a 20% concentration into the hexane mediated by mechanical mixture by vortex. An aliquot of 1mL of the aqueous phase was then diluted 10 times, and a second aliquot of this new solution was then diluted 20 times. The objective of these series of dilutions is the elimination of the hexane traces present after the clean-up procedure, that could interfere in the chromatography. Regarding to Figure 2.b, we have the cleanest chromatogram obtained in this analytical procedure. This corresponds to the change of the septa batch employed in previous analyses. The last peak of the chromatogram, just before of the change to the back-flush mode, that is also present in the BTEX chromatograms, disappeared from the chromatogram. From our observation, these compounds could be derived from the septa manufacturing, and their presence is difficult to control. Anyway, this compound does not interfere with the peaks of none of the analytes of interest.

Figure S.3. Chromatograms for a purged solution of 100 ng of CH₃Hg and Hg(II) (20 and 24 ng of C respectively): a) Chromatogram including impurities; b) Chromatogram after clean-up step of the derivatization reagent.



E. Discusión integradora

La presente tesis doctoral se ha enfocado en el desarrollo y aplicación de metodologías para el estudio del origen y la determinación de especies químicas de Hg en muestras biológicas. En primer lugar, se ha llevado a cabo su especiación y cuantificación en muestras principalmente humanas. Por otro lado, se ha desarrollado un método para la medida de las relaciones isotópicas específicas de cada compuesto con alta precisión y exactitud con el fin de aplicarlo a muestras biológicas. Todo ello ha llevado a adquirir un conocimiento más amplio sobre las diferentes especies de Hg y su comportamiento a nivel analítico y biológico. La cuantificación de dichas especies se ha realizado mediante IDMS con múltiples trazadores, que es, a día de hoy, la técnica que ofrece unos resultados de mayor calidad en cuanto a precisión y exactitud. La simplificación y normalización de las condiciones de preparación de la muestra y de la medida, facilitan la implementación de estos procedimientos en trabajos de rutina y en estudios a gran escala.

El desarrollo de metodologías que ofrezcan resultados fiables y de calidad requiere de la disponibilidad de materiales certificados que cumplan los requisitos de similitud con la matriz y el rango de concentración de los analitos respecto a la muestra real. En esta tesis doctoral se participó, junto con el National Institute of Standards and Technology de Estados Unidos (NIST) en la certificación del material NIST SRM 1974c. Este trabajo se encuentra recogido en el **Artículo II** de la tesis doctoral. El material consiste en un tejido de mejillón (*Mytilus edulis*) cuya matriz únicamente fue homogeneizada y congelada. Este tipo de matrices son las más parecidas a las muestras reales, debido al escaso tratamiento al que son sometidas. Por tanto, permiten validar el procedimiento analítico completo, desde la extracción hasta la cuantificación de los analitos. La determinación de las especies de Hg, MeHg y Hg(II), se realizó por IDMS con doble trazador, combinado con GC-ICP-MS. Esta metodología de cuantificación permite corregir las transformaciones que experimentan las dos especies de Hg. Los factores de transformación de la especie de Hg(II) en la especie de MeHg obtenidos en las réplicas analizadas oscilaron entre 0,44 y 1,16%, y la transformación de Hg(II) en MeHg entre 1.27 y 3.99%. En este trabajo también se determinaron concentraciones de compuestos de butil estaño, en este caso por dilución isotópica sencilla, al haberse determinado en una publicación previa que en las condiciones

experimentales empleadas las transformaciones eran insignificantes.²⁰⁸ Las concentraciones obtenidas para el NIST SRM 1974c en este trabajo se muestran en la Figura E.1, junto con los valores ya certificados del material.

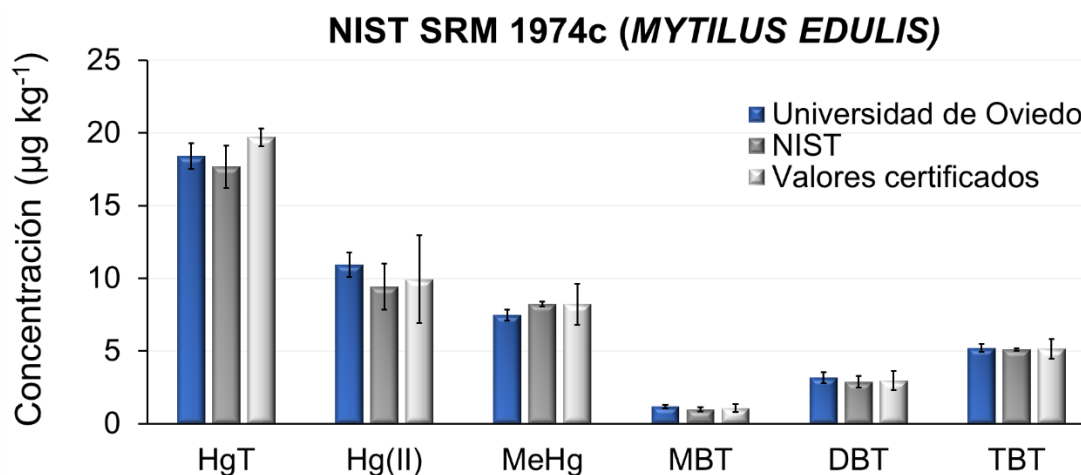


Figura E.1. Concentraciones experimentales y certificadas para las especies de Hg(II), MeHg, MBT, DBT, TBT y el contenido total de Hg en el material NIST SRM 1974c.

En la validación del método empleado, se utilizó el material de referencia DOLT-4 cuya matriz es un tejido de pescado (hígado de pez perro). La similitud de la matriz de este material sirvió para evaluar el procedimiento de extracción por microondas, que posteriormente fue aplicado al tejido de mejillón. Se encontró en este caso que el método, empleado en un trabajo previo,¹⁹⁹ permitía obtener los valores certificados del material con buena exactitud y precisión. De este modo se optó por una extracción por microondas focalizadas a 70°C durante 4 min. Los resultados obtenidos para este material por la metodología empleada en este trabajo se muestran en la Figura E.2. A la hora de determinar concentraciones tan bajas (rango de los ng g⁻¹) se hace esencial el paso de preconcentración de la muestra previo a la inyección. Esta preconcentración, se realiza mediante evaporación del disolvente orgánico en la última etapa analítica y se hace hasta el mínimo volumen suficiente para realizar tres inyecciones (10 µL).

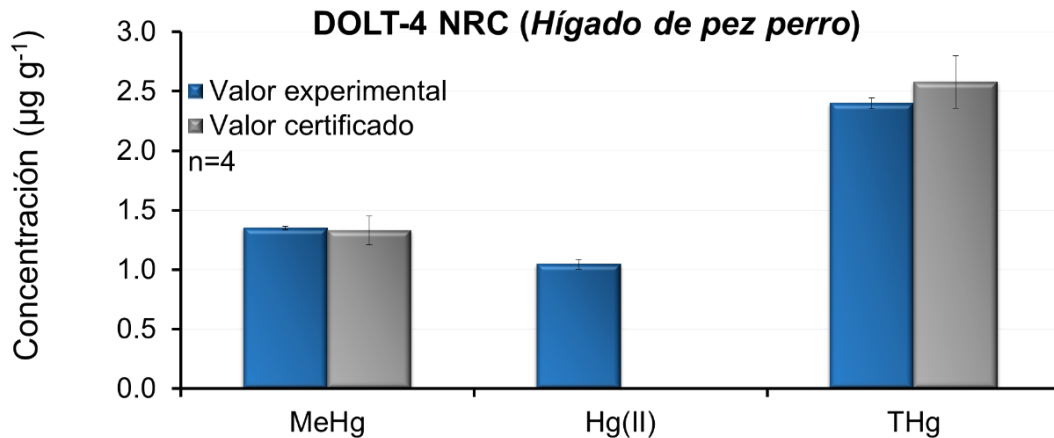


Figura E.2. Concentraciones experimentales obtenidas en este trabajo para el material DOLT-4 (*Hígado de pez perro*).

El interés creciente en la determinación de la especie de EtHg, incorporado a la sangre a través de las vacunas, hace necesario el desarrollo de metodologías que permitan su determinación junto con las otras dos especies más comunes en el organismo, MeHg y Hg(II). En esta tesis doctoral se desarrolló, por tanto, una metodología de IDMS con triple trazador que permitía la determinación de las tres especies de mercurio con exactitud y precisión, a través de la corrección de las transformaciones. El método desarrollado fue publicado en el **Artículo I** de esta tesis doctoral. En nuestro trabajo hemos desarrollado y validado una metodología común para la medida de MeHg, EtHg y Hg(II) en los tres bioindicadores más comunes en el organismo de los seres humanos: sangre, orina y pelo. Esta metodología se ha validado en tres materiales de referencia IAEA-085, IAEA-086 y los tres niveles del NIST SRM 955c, y también a través de recuperaciones en muestras de orina fortificadas.

En el caso de los materiales de pelo humano certificados IAEA-085 y IAEA-086, los resultados obtenidos se muestran en la Figura E.3. En estas muestras, ha surgido la primera limitación de la metodología,³⁴² ya que las muestras presentan concentraciones de las especies en distinto rango, como sucede con el EtHg y especialmente para el material IAEA-085. Esto genera un error de cálculo en el modelo matemático, el cual se ha minimizado mediante la introducción del trazador ¹⁹⁸EtHg en un rango de concentración similar a las demás especies.

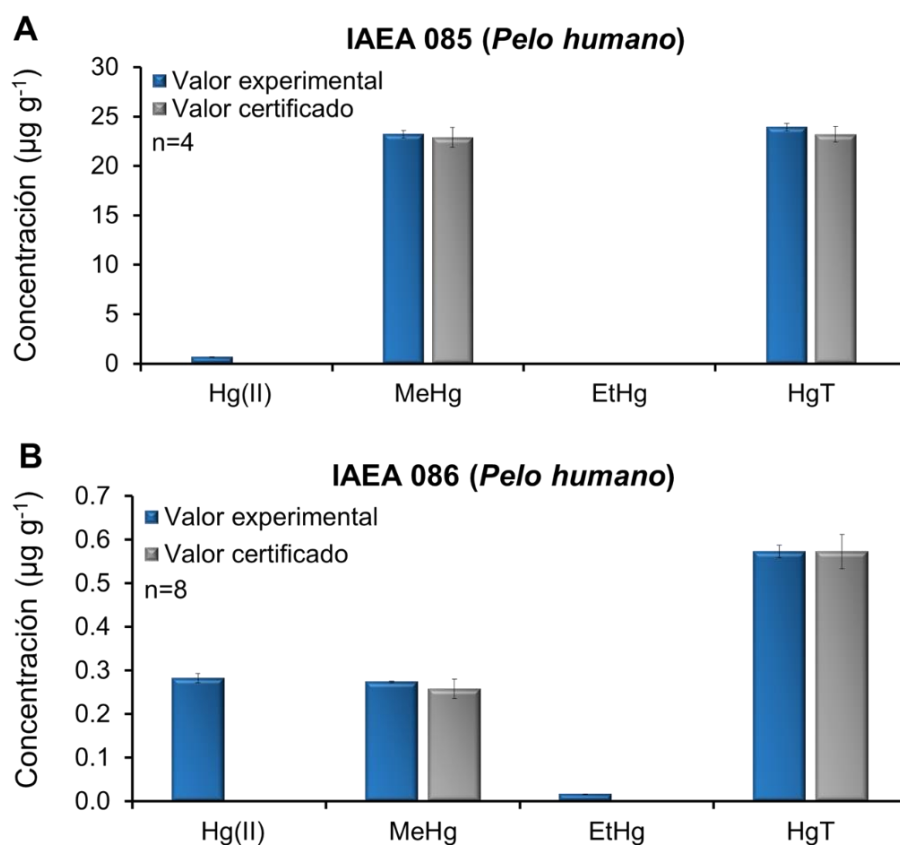


Figura E.3. Concentraciones experimentales obtenidas en este trabajo y certificadas para los materiales de pelo humano: (A) IAEA-085 y (B) IAEA-086.

En el caso de las muestras de orina, al no haber un material de referencia certificado se emplearon muestras fortificadas. La principal dificultad en el análisis de muestras de orina se encuentra en la reproducibilidad entre réplicas, ya que, si se emplea una misma muestra, sus propiedades van cambiando a lo largo del tiempo debido a la precipitación de diferentes compuestos. Este problema se solucionó tomando una muestra de orina y dividiéndola en alícuotas de 0.5 g que posteriormente eran congeladas hasta el momento del análisis. De este modo, cada alícuota se descongelaba e inmediatamente se le añadían los trazadores enriquecidos. Los resultados de las recuperaciones obtenidas en las muestras fortificadas de orina por IDMS con trazador triple se muestran en la Figura E.4. Se observa que, tras haber sustraído la contribución natural de la muestra de orina, el valor medio en las recuperaciones es bastante próximo al 100% para niveles de concentración muy bajos de 1,2 y 5 ng g^{-1} .

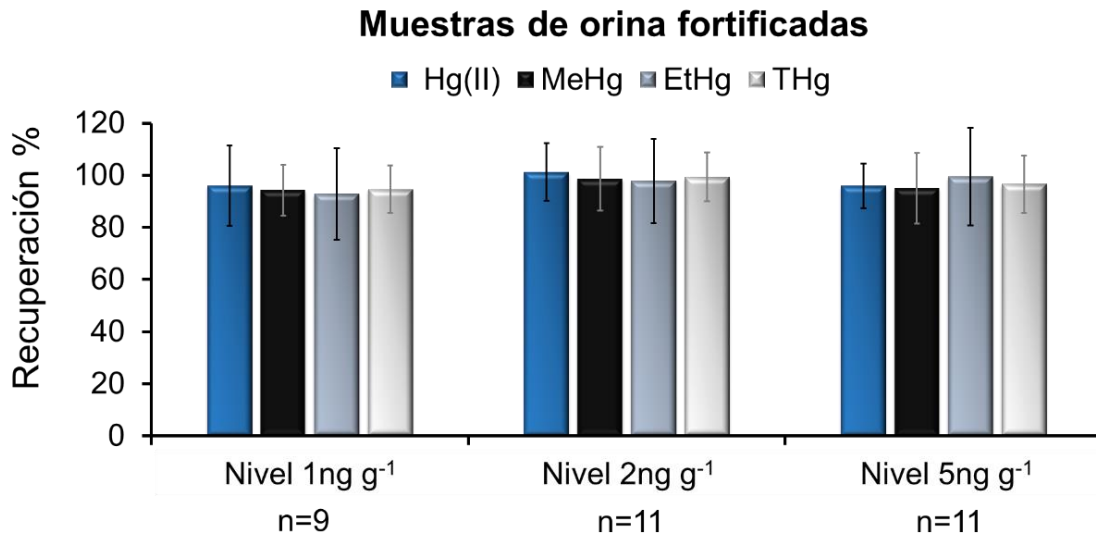


Figura E.4. Valores de las recuperaciones obtenidas en este trabajo para las muestras de orina fortificadas con concentraciones de 1, 2 y 5 ng g⁻¹ de las especies Hg(II), MeHg y EtHg.

En este trabajo, el desarrollo de la metodología para medir MeHg, EtHg y Hg(II) en sangre es el que ha supuesto un mayor desafío, debido a la complejidad de la matriz. En este caso se ha empleado un material de referencia certificado en especies de Hg cuya matriz es sangre de cabra (NIST SRM 955c). Este material presenta cuatro niveles de concentración, de los que se han analizado los Niveles 2, 3 y 4. Sólo el nivel 3 está certificado en concentraciones de MeHg, EtHg y Hg(II), los otros dos están certificados únicamente en HgT. Los valores de especiación para los niveles 2 y 4 han sido publicados por primera vez en el **Artículo I** de esta Tesis Doctoral. Una de las peculiaridades de este análisis es que el material de referencia empleado en las muestras de sangre no contenía niveles endógenos de los analitos, sino que las especies de Hg habían sido añadidas a la sangre. El Hg en muestras reales se encuentra en la sangre asociado a proteínas y otros constituyentes de la matriz, y este tipo de interacciones parecen no establecerse a la hora de fortificar las muestras de sangre con las especies de Hg. Esto supuso un problema en el análisis de las muestras reales de sangre humana, ya que el proceso de extracción/derivatización hubo de ser modificado reduciendo la cantidad de muestra tratada. La metodología desarrollada se validó a partir del material NIST SRM 955c con resultados satisfactorios, sin embargo, la solubilización y derivatización de los analitos en las muestras reales resultó ser ineficiente en las condiciones optimizadas para el material de referencia. En

primer lugar, se modificaron las condiciones de extracción en microondas, pero no se obtuvo mejora. Únicamente la reducción de la cantidad de muestra inicial, de 0.5 g a 0.15 g, nos permitió obtener resultados precisos en el caso de las muestras de sangre humana.

En la Figura E.5. se muestran los valores de concentración obtenidos para la especiación de mercurio en los Niveles 2, 3 y 4 del material de sangre de cabra NIST SRM 955c. Los límites de detección obtenidos para esta metodología son 0.11, 0.02 and 0.11 ng Hg g⁻¹ para Hg(II), MeHg y EtHg respectivamente.

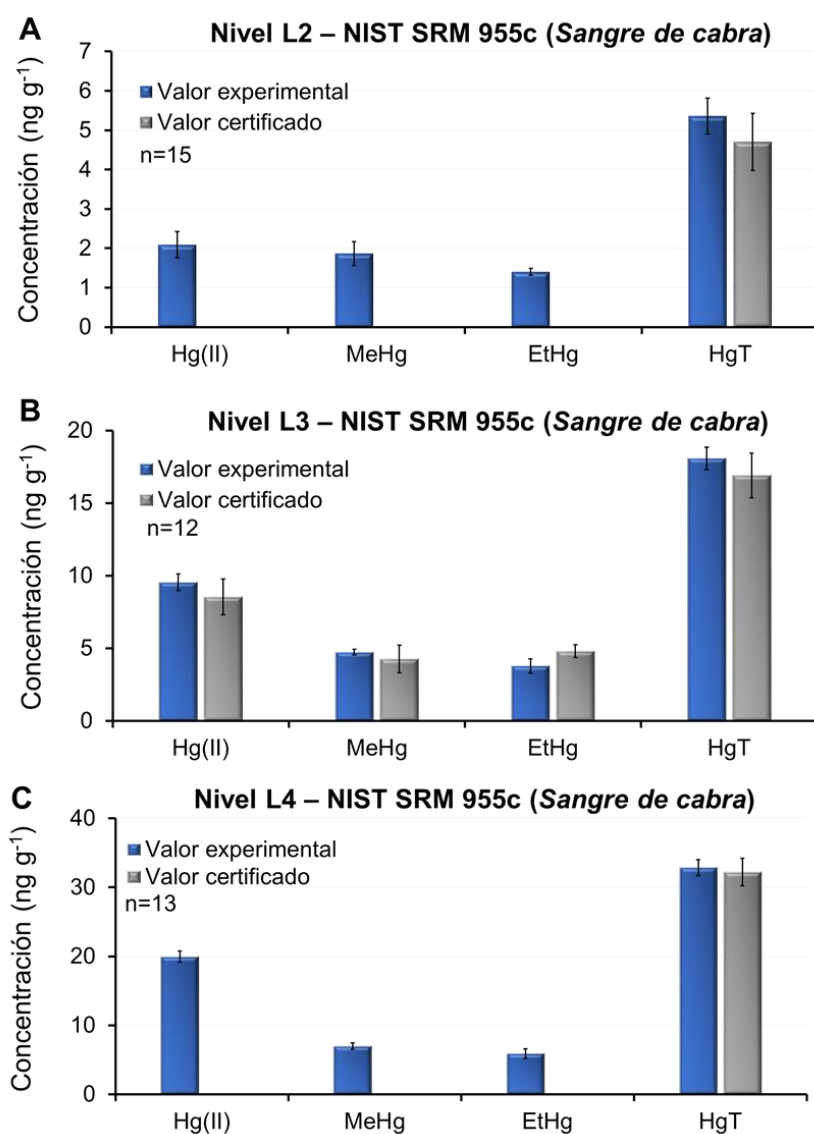


Figura E.5. Concentraciones de MeHg, EtHg, Hg(II) y HgT obtenidas en este trabajo y certificadas para los niveles de concentración 2 (A), 3 (B) y 4 (C) del material NIST SRM 955c.

En cuanto a los factores de transformación obtenidos, se ha observado que no solo dependen de la especie, sino también de la naturaleza de la matriz en que se encuentra. Las menores transformaciones se dan para las muestras de orina y las mayores para la sangre. La especie que experimenta un mayor grado de transformación, por desalquilación, es el EtHg, lo que puede relacionarse con su labilidad, ya que también se ha demostrado que en el organismo se degrada rápidamente a Hg(II).^{34,78} Como se ha observado a lo largo de este trabajo, las etapas analíticas previas al análisis y especialmente la reacción de derivatización inducen transformación entre especies como se observa en la Figura E.6 al aumentar la cantidad de reactivo derivatizante.

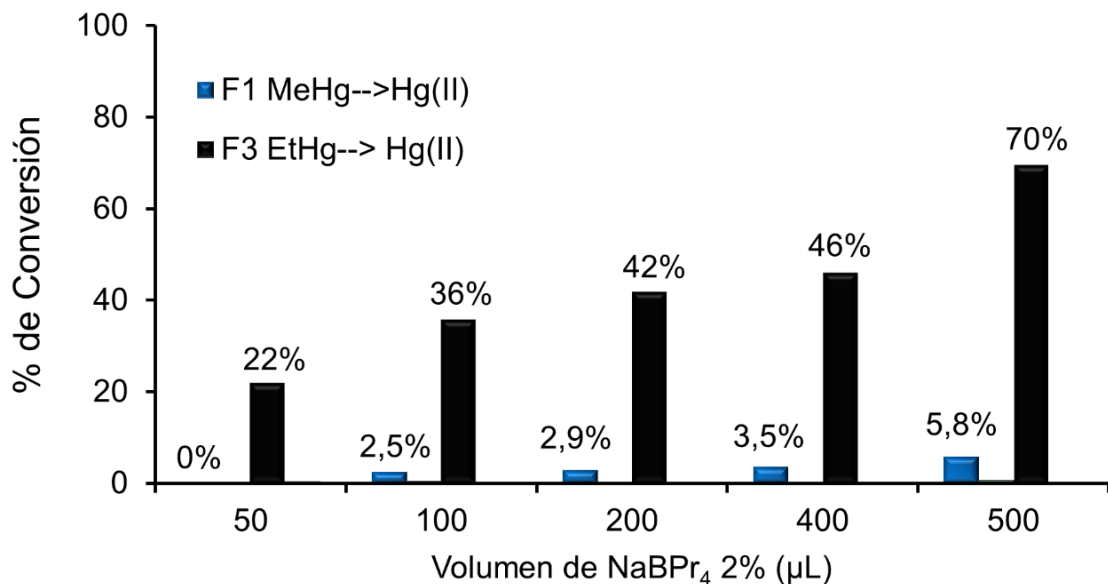


Figura E.6. Factores de transformación para niveles crecientes de NaBPr₄ en 1mL de extracto del Nivel L2 del NIST SRM 955c.

También es especialmente significativa la transformación de MeHg a Hg(II), que se observa en determinadas condiciones experimentales ya que, no siendo la mayor de las transformaciones, sí que puede dar lugar a errores de cuantificación si no se lleva a cabo su corrección. Otro proceso importante es la reducción de las especies de Hg a Hg(0). En este caso se ha observado experimentalmente que un exceso de reactivo derivatizante puede causar la total degradación de las especies de Hg a Hg(0), como se muestra en la Figura E.7 para 2 mL de NaBPr₄ al 2% en comparación con las condiciones óptimas.

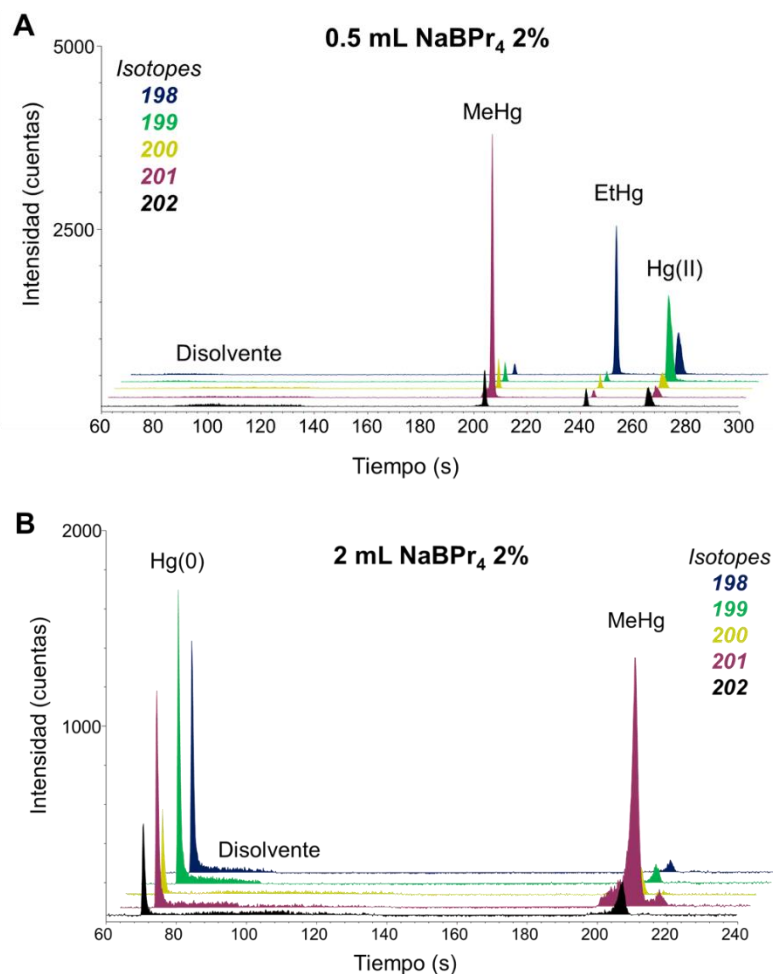


Figura E.7. Cromatogramas obtenidos para un mismo extracto de muestra tras añadir: (A) 0.5 mL NaBPr₄ y (B) 2 mL de NaBPr₄ al 2% en agua.

El empleo de microondas focalizadas en este tipo de análisis ha mostrado una gran eficacia, no sólo en la extracción con condiciones controladas, sino también para evitar la contaminación cruzada. Por otro lado, el procedimiento de derivatización fue clave a lo largo de los diferentes trabajos presentados en la presente tesis doctoral, ya que es un factor difícil de controlar, y que requiere una optimización específica en cada caso. En este trabajo, el procedimiento de preparación del derivatizante se optimizó para evitar su degradación. Se encontró que la mejor manera de conservar el reactivo en términos de estabilidad era disuelto en THF. Con esto se consiguió preservar el reactivo un mayor tiempo, y además controlar su eficiencia a la hora de llevar a cabo la reacción. El derivatizante almacenado en agua tenía un

tiempo de vida mucho menor, se degradaba más fácilmente y era más difícil de prever su funcionalidad, con lo que el coste derivado de un mayor gasto también se incrementaba.

La posibilidad de analizar muestras reales ha servido para verificar la aplicabilidad de la metodología. En este caso, el interés del conjunto de muestras seleccionado se debió a que los individuos habían sufrido una exposición aguda a Hg. Dicha exposición fue evidenciada en el trabajo publicado en el **Artículo III**, para cuatro de estos individuos donde, mediante ablación láser, se observaron concentraciones elevadas de Hg(II) que habían sido incorporadas al pelo por adsorción. En la Figura E.8. se muestran los perfiles de ablación láser obtenidos para una de las muestras de pelo. En primer lugar, las muestras analizadas reflejan un incremento de la concentración de Hg aproximadamente a la misma distancia de la raíz (unos 40 mm). Esto indicaría que todo el pelo a partir de ese punto estuvo expuesto a elevadas concentraciones de Hg(0). Por otra parte, se observa un incremento significativo de la concentración de Hg en esa zona respecto a la zona no expuesta (en el pelo 1 aprox 1000 veces más señal de ^{202}Hg).

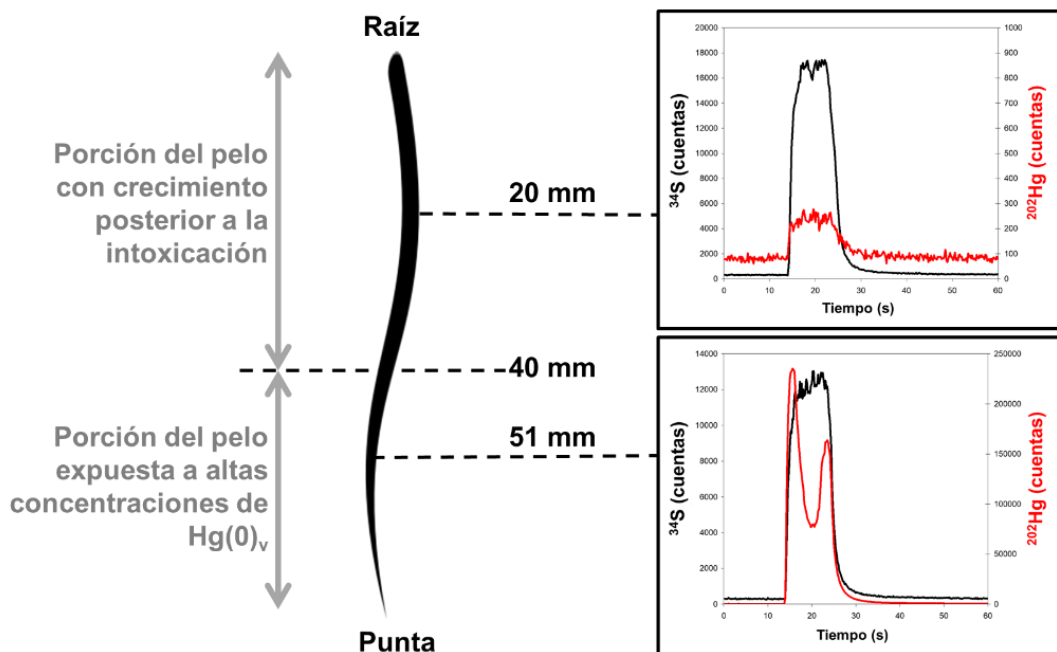


Figura E.8. Esquema de los perfiles de ablación láser para una de las muestras de pelo en función de su distancia a la raíz.

Mediante el análisis de especiación (Figura E.9) se determinó que esa concentración elevada de Hg se correspondía con la especie de Hg(II). La mayor acumulación de Hg se da en la parte externa del pelo, lo que se explica por la adsorción externa de Hg(0) vapor, que a su vez oxida el Hg(0) a Hg(II). Si fuese endógeno observaríamos una señal de Hg constante a lo largo de la sección de pelo. Mientras tanto, la concentración de ^{34}S sí se mantiene aproximadamente constante.

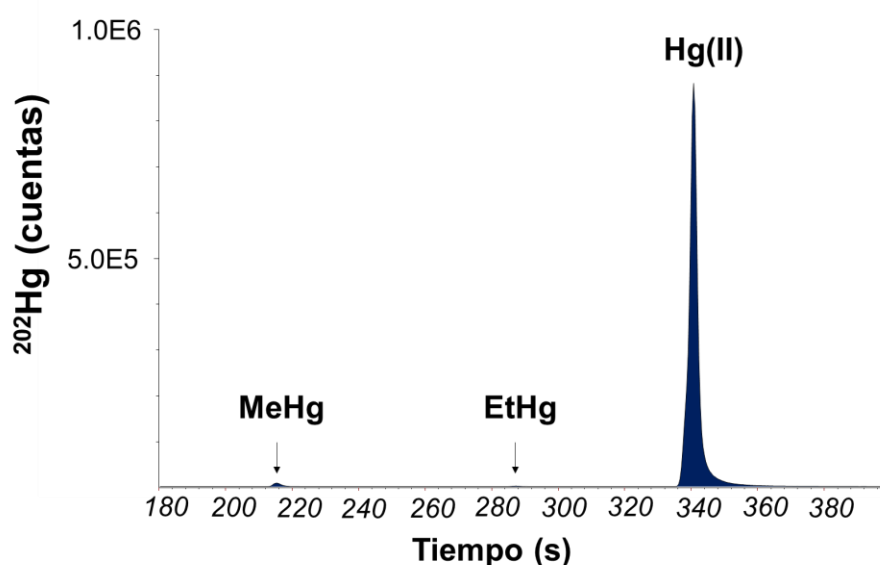


Figura E.9. Cromatograma de las especies de Hg obtenido para las muestras de pelo analizadas previamente por ablación láser.

Ante la posibilidad de obtener más muestras de estos individuos, se decidió emplear las mismas en la aplicación de la metodología previamente desarrollada. La determinación de MeHg, EtHg y Hg(II) en muestras reales no sólo ha servido para verificar la aplicabilidad del método, sino también para realizar un estudio de la distribución de especies en los tres principales bioindicadores: sangre, orina y pelo. Los resultados obtenidos en la medida de las especies de Hg en las muestras de sangre, pelo y orina se han publicado en el **Artículo IV** de esta tesis doctoral. La concentración promedio de los individuos en este estudio estaría de acuerdo con los valores obtenidos en estudios de personas de la misma región³²⁰ (Informe Consejería) con posible exposición ocupacional y sin exposición ocupacional. Sorprendentemente, el promedio del HgT en sangre de la población asturiana (expuesta ocupacionalmente y no expuesta)

presenta valores de THg en sangre comparables a los de las regiones contaminadas debido a la minería artesanal de oro con Hg en Filipinas, Indonesia o Zimbabwe.³⁰⁰ También resultan llamativos los elevados valores de MeHg en algunas muestras como el individuo 14 con 21.6 ng g⁻¹, especialmente cuando él mismo indicó que no consumía pescado. Las concentraciones obtenidas se han representado en la Figura E.10, divididas en sangre, orina y pelo. Las muestras se han separado en los dos grupos más importantes de este estudio, que son los de individuos intoxicados y el grupo de control con individuos sin exposición a Hg(0)_v.

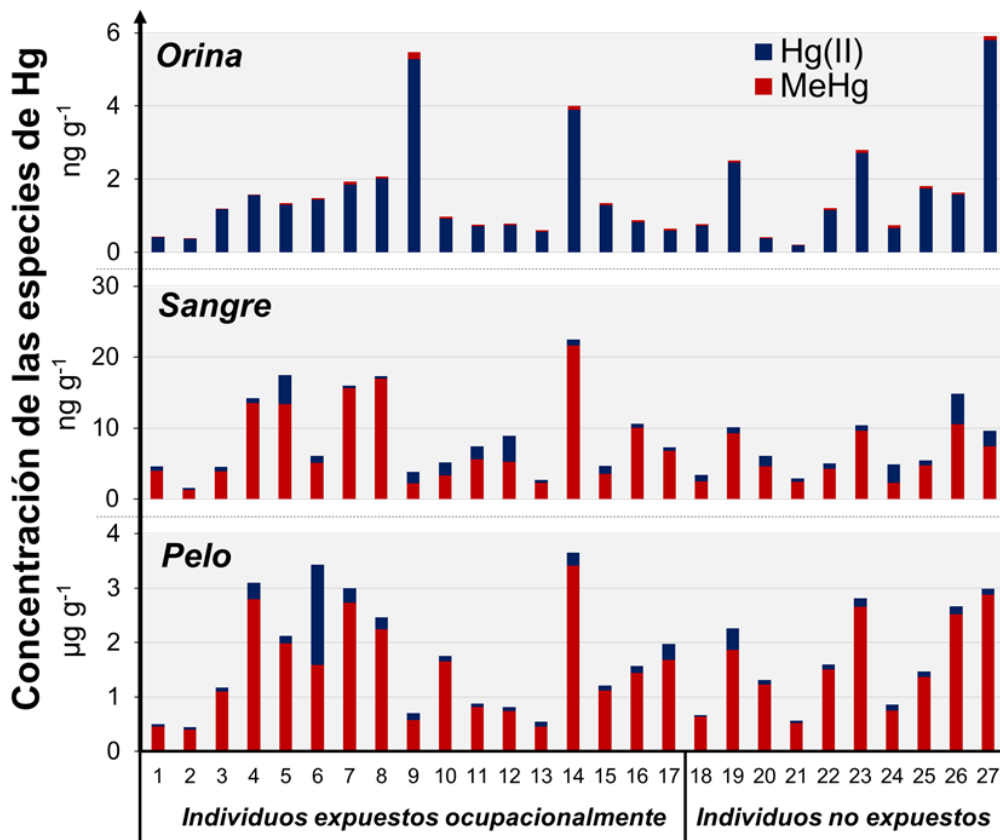


Figura E.10. Concentraciones de MeHg y Hg(II) en las muestras de orina, sangre y pelo de los 27 individuos evaluados en este estudio.

La relación entre el MeHg en pelo y sangre refleja que el grupo de intoxicados y el grupo control presentan diferente tendencia en la deposición. En el caso del grupo control, el valor promedio extraído de la línea de tendencia para el MeHg en pelo vs. sangre, sería de 245, prácticamente equivalente al valor establecido por el JECFA (250) como valor de referencia.¹²² Sin embargo, en el grupo de intoxicado esta relación es de 135, por lo que depositan menos

MeHg en pelo respecto al que tienen en sangre, en comparación con el grupo control. A su vez, existe una correlación entre las concentraciones en pelo de MeHg de los individuos intoxicados con sus respectivos familiares no expuestos. También se puede correlacionar el MeHg en pelo con el Hg(II) en la orina, en este caso para todos los individuos. La conclusión de esto es que la intoxicación ha causado una modificación en el MeHg que se encuentra en la sangre de los individuos intoxicados. Este MeHg no se comporta de la misma forma que lo hace en individuos no expuestos. En el grupo control, cabe esperar que el MeHg se deba únicamente al consumo de pescado, y que este MeHg se deposite en el pelo dando una concentración de 250 veces mayor que en sangre. En el grupo de intoxicados existe una parte del MeHg en sangre que no sigue ese comportamiento, y que no se deposita en el pelo, lo que se refleja en una concentración de MeHg en pelo sólo 135 veces la concentración en sangre. Además, cabría esperar que el MeHg incorporado por vía alimentaria siguiese el mismo comportamiento de acumulación, ya que el MeHg en pelo sí está correlacionado entre parejas de familiares. Esta correlación tiene un coeficiente de regresión lineal de $r^2 = 0.9355$, excluyendo uno de los valores atípicos que corresponde a uno de los pares donde los miembros manifiestan residir en diferentes ubicaciones. La única explicación de esto, ya que salvo en un caso, no hay factores genéticos comunes, es la dieta común de estos familiares. Esta correlación entre familiares no existe en las concentraciones en sangre de MeHg.

En nuestro trabajo, gracias a los datos de especiación, pudimos representar directamente la correlación de las concentraciones de MeHg en el pelo de individuos con las concentraciones de Hg(II) en la orina. Las pendientes de ambas correlaciones son más o menos de la misma magnitud para individuos expuestos y no expuestos (883 y 885 respectivamente) y coeficientes de regresión lineal de 0.71 y 0.87. De estas correlaciones, se extrae, como se ha publicado en otras investigaciones,⁹¹ que una parte importante del Hg(II) en la orina proviene principalmente de la desmetilación del MeHg. Sin embargo, la correlación en el caso de la sangre no está tan clara para todos los individuos, y es más pronunciada en el grupo de no expuestos. A partir de estas observaciones se extrae que hay una porción de MeHg en la sangre del grupo de los individuos intoxicados que sigue un comportamiento anómalo en su deposición en pelo, también

lo sigue en el proceso de desmetilación y extracción en orina. Además, existen dos valores atípicos en ambos diagramas, que son las dos personas con los niveles más altos de Hg(II) en la orina. En el caso del individuo 27, tenemos una posible exposición reciente a Hg(0) derivada de sus amalgamas dentales¹⁰⁸, lo que explicaría que no siga la línea de tendencia que corresponde con la desmetilación de MeHg.⁹¹ Para el individuo 9, con la información que tenemos disponible, no se ha encontrado ningún factor que pueda influir en su diferencia de comportamiento con respecto a las otras muestras.

En la bibliografía existen varios estudios de personas expuestas a altas dosis de Hg(0), que resulta en un aumento en los niveles de MeHg en la sangre. Para explicarlo se han publicado varias hipótesis, como diferentes sitios de unión,^{313,343} o una menor estabilidad de la interacción del MeHg respecto al Hg(II) en los tejidos. Puesto que a día de hoy no se ha podido demostrar la existencia de metilación *in vivo* que genere niveles de MeHg significativos en sangre, la opción más ajustada a nuestros datos es una removilización de los depósitos de MeHg debida a la intoxicación. Este MeHg que es liberado a la sangre, presenta diferentes interacciones con otras moléculas que el MeHg que se ingiere a través de la dieta. Eso puede provocar que su comportamiento sea diferente y que no siga la misma tendencia de deposición en pelo y de desmetilación y excreción en orina. Esta hipótesis explicaría por qué las personas que niegan consumir pescado o lo hacen de manera bastante moderada, tienen concentraciones tan altas de MeHg en la sangre.

Es la primera vez que se realiza un estudio de estas características a través de concentraciones de especies de Hg en sangre, orina y pelo, determinadas mediante una metodología que proporciona resultados de alta precisión y exactitud. La aplicación a muestras reales demuestra la fiabilidad de la metodología, obteniendo resultados que están de acuerdo con evidencias previamente obtenidas en otros estudios. En vista de los resultados, cabría resaltar la importancia del análisis de especiación, que podría, por ejemplo, diferenciar entre poblaciones con un alto consumo de pescado contaminado, o con una alta exposición a Hg(0).

Si todos estos estudios proporcionaran concentraciones de las diferentes especies, la información sobre las fuentes de contaminación sería mucho más amplia.

Una vez que se han determinado las concentraciones de las distintas especies de mercurio, es de vital importancia conocer el origen de cada una de ellas. Si bien, las propias especies ya aportan información sobre su procedencia, aún existen transformaciones y rutas metabólicas en el organismo que permanecen sin explorar. El análisis de relaciones isotópicas con alta precisión y exactitud ha demostrado tener capacidad de discriminar entre procesos y también entre fuentes de origen de las especies de Hg. El principal inconveniente de su utilización es la escasez de metodologías en este campo que permitan una medida exacta y precisa de las relaciones isotópicas específicas del compuesto tras una separación cromatográfica de las especies. Las pocas metodologías desarrolladas hasta la fecha han empleado programas para ensanchar el pico cromatográfico. Con esto se conseguía un mayor número de puntos de medida sobre el pico cromatográfico. Sin embargo, este ensanchamiento también reduce drásticamente la señal de Hg. En nuestro trabajo, presentado en el **Artículo V**, se empleó un programa de isotermas para ensanchar el pico. Cuando se trabaja con dos programas de isotermas, una para ensanchar el pico de MeHg y otra para el pico de Hg(II), a la vez que se ensanchan, el segundo pico de Hg(II) reduce mucho su intensidad. En la Figura E.11 se muestra la disminución en la señal al pasar de un programa de GC convencional (a) a otro con una isoterma (b) y a otro con dos isotermas (c), para una inyección en el GC de 0.5 ng de Hg(II)- NIST 3133.

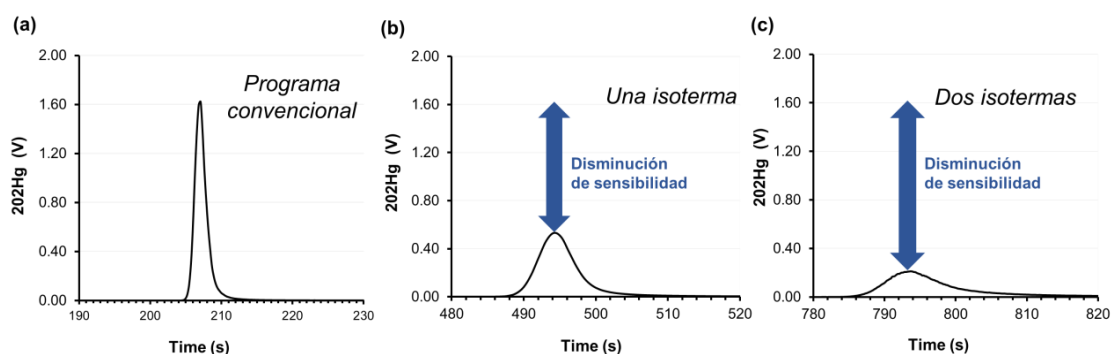


Figura E.11. Cromatogramas para una inyección de 0.5 ng de Hg(II) con un programa de GC convencional (a), de una isoterma (b) y de dos isotermas (c).

Debido a esta reducción drástica en la intensidad de pico, en la evaluación de los parámetros de medida se prefirió emplear un programa con una sola isoterma. Además, únicamente se poseía un material de referencia certificado en relaciones isotópicas el NIST 3133 que corresponde a Hg(II), por tanto, no se utilizó el patrón de MeHg. De esta forma, a la vez que se obtenía una intensidad de pico mayor, también se reducía el tiempo de análisis. La reducción en la intensidad de pico empeora la reproducibilidad en la medida de relaciones isotópicas.

El principal avance que se obtuvo, a través de la metodología desarrollada en este trabajo, es la mejora de la precisión al emplear un pico estrecho. La precisión externa a través de medidas de δ_{cero} (estrategia de bracketing NIST 3133-NIST 3133-NIST 3133) osciló entre 0.420 y 0.874 ‰, utilizando el método LRS que trabaja con picos de GC estrechos, de 0.131 s de tiempo de integración y seleccionando entre 321 y 641 puntos de adquisición. Para un menor número de puntos la precisión disminuye (entre 0.575 y 1.291‰). Estos resultados demuestran la importancia de incluir un número suficiente de puntos de adquisición del fondo cuando se trabaja con el método LRS. También se obtuvo una peor reproducibilidad externa utilizando el método LRS al trabajar con picos cromatográficos anchos, ya que los mejores valores de 2SD variaron entre 0.341 y 0.591 ‰ con 81 puntos de adquisición.

El método PbP y el método PAI no consiguieron mejorar los resultados de precisión externa obtenidos para LRS. La integración del área de pico se aplicó inicialmente como estrategia de reducción de datos, obteniendo una precisión 2SD externa de 0.56 ‰ para $\delta^{202}\text{Hg}$.¹⁸¹ Más recientemente, se demostró que se obtuvo mejor precisión y exactitud aplicando LRS con picos cromatográficos anchos (0.2-0.5 ‰ para $\delta^{202}\text{Hg}$).¹⁵⁸ Para la metodología desarrollada se han publicado los valores de δ_{cero} del Hg(II)-NIST 3133 respecto del Hg(II)-NIST 3133 para n=25, los cuales como se refleja en la Figura E.12. presentan una precisión externa entre 0.24 y 0.49 ‰ como 2SD. Esta precisión es comparable con los valores obtenidos en trabajos previos llevados a cabo en medidas sobre picos ensanchados, para un mayor de número de puntos.

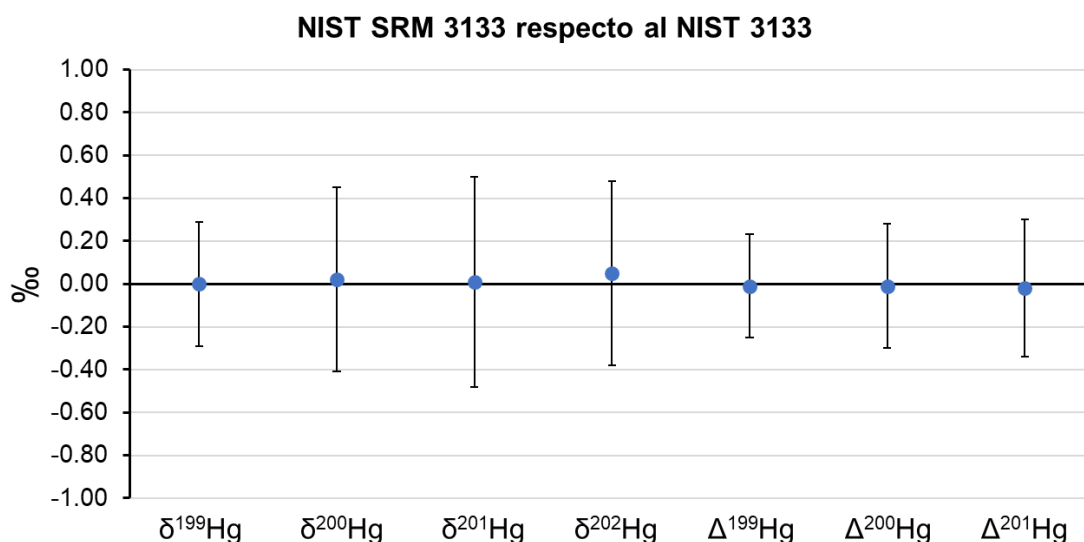


Figura E.12. Valores de δ y Δ de Hg(II)-NIST 3133 respecto al Hg(II)-NIST 3133.

La exactitud se ha evaluado con el material NIST RM 8610 y los resultados se muestran en la Figura E.13 (n=25 medidas). Hay que destacar que la diferencia en la precisión entre valores experimentales y certificados se debe a que en los segundos la medida se realizó mediante generación de vapor frío, es decir, sobre una señal continua.

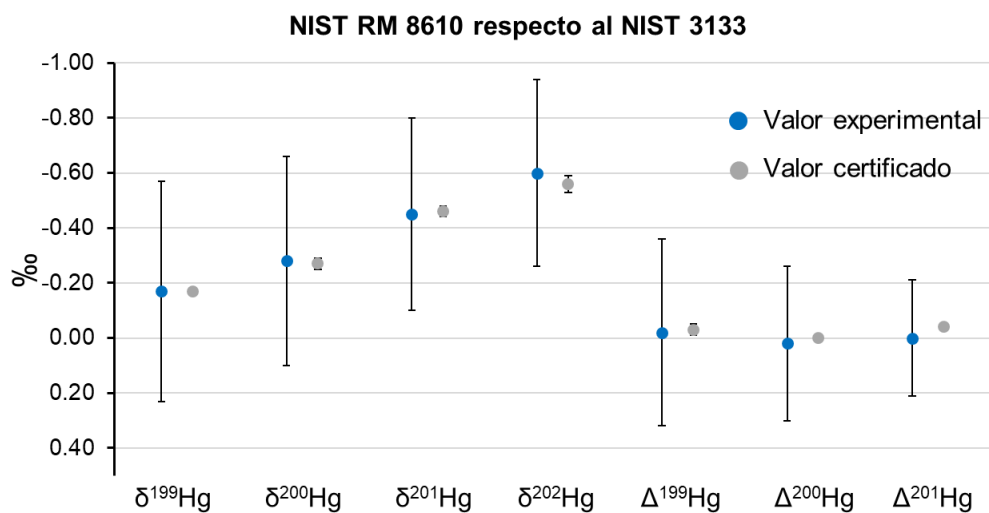


Figura E.13. Valores de δ y Δ de Hg(II)-NIST RM 8610 respecto al Hg(II)-NIST 3133.

Finalmente, también se evaluó la influencia de la corrección del desfase temporal de las copas de Faraday en la precisión externa de los valores delta de Hg específicos de la especie. Se ha observado que la corrección del desfase temporal en las medidas realizadas no influye en el valor del δ . Este desfase temporal únicamente afecta a la precisión interna obtenida en el cálculo de las relaciones isotópicas. Además, el desfase temporal sólo modifica las intensidades medidas con los tiempos de integración más bajos (0.1s o 0.2s), ya que el valor del desfase temporal oscila entre 0.0018 y 0.0034 s según la copa de Faraday. Por tanto, este desfase no se aprecia cuando se mide con tiempos de integración de 0.5 y 1s.

En resumen, se ha demostrado que la metodología empleada permite la medida de relaciones isotópicas específicas de MeHg y Hg(II) con exactitud y precisión. Con la instrumentación utilizada en este trabajo, la mejor precisión se obtiene con picos cromatográficos estrechos, con buena sensibilidad (por encima de 1V) y con tiempos de integración cortos (0.1s), que proporcionan un elevado número de puntos sobre el pico. Del mismo modo, el método de cálculo que proporciona los mejores resultados es el LRS mediante el cálculo a partir de número de puntos suficiente (321 puntos).

Uno de los mayores desafíos en la medida de relaciones isotópicas de especies de Hg es el incremento de la sensibilidad, que unido a las bajas concentraciones (rango ng o $\mu\text{g g}^{-1}$) en muestras biológicas dificulta el análisis. Una de las opciones instrumentales para esta mejora sería el empleo de un inyector de temperatura programable (PTV) que, como se ha demostrado en un publicación reciente, permite disminuir los límites de detección.³³¹ Otra opción es el empleo de un sistema de purga y trampa que elimine el disolvente a la vez que retiene los compuestos de Hg. Con el objetivo de incrementar esa sensibilidad, se ha puesto a punto un sistema de Purga y Trampa acoplado a un instrumento GC-IRMS para la medida de relaciones isotópicas de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Los resultados del desarrollo de este sistema de medida de $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ se han presentado en el **Artículo VI** de esta tesis doctoral.

Como se ha venido comentando a lo largo de la tesis doctoral, el origen del MeHg es uno de los mayores enigmas en el ciclo biogeoquímico. Se sabe que su origen está ligado a la actividad bacteriana, a la presencia de materia orgánica, a la falta de oxígeno y a la posesión de determinados genes metilantes. Sin embargo, aún hay incógnitas en cuanto a la producción en determinados compartimentos medioambientales. El MeHg llega a los seres humanos a través del consumo de pescado. Lo que hemos constatado mediante el análisis de concentraciones de MeHg en los principales bioindicadores en humanos (sangre, pelo y orina). Que además ese MeHg proceda de una formación endógena en el organismo no ha sido demostrado hasta la fecha. Únicamente se han encontrado algunos compartimentos que sí son susceptibles de metilar, pero en ningún caso que aporten concentraciones significativas de MeHg a la sangre. Por tanto, sólo se puede pensar en que el MeHg tiene su origen en los ecosistemas acuáticos y su bioacumulación y biomagnificación a través de la cadena trófica llega hasta nosotros. Para determinar el origen o los procesos por los que atraviesa el MeHg la mayoría de las metodologías, se basan en la medida de las relaciones isotópicas de alta precisión en el Hg. Sin embargo, el estudio del grupo CH₃ incorporado al mercurio puede aportar valiosa información acerca de la procedencia de la especie, y del procedimiento de metilación. Este grupo podría tener un origen endógeno en el ecosistema o en el compartimento ambiental donde se origina el MeHg. Las medidas de relaciones isotópicas de C se realizaron mediante la metodología específica de GC-C-IRMS.

Como se ha evidenciado previamente el proceso de derivatización puede inducir fraccionamiento, tanto de los isótopos de Hg como de los isótopos de C, ya que induce transformaciones entre las especies de Hg. Para determinar la eficiencia de la transferencia de los analitos desde la disolución hasta su detección por GC-C-IRMS se ha empleado una disolución de compuestos orgánicos volátiles (BTEX), que no requieren derivatización. Esta disolución se empleó como estándar secundario en las medidas de $\delta^{13}\text{C}$. Tanto en el caso de las especies de Hg como de los BTEX se ha evaluado la linealidad del método desarrollado a diferentes concentraciones. Los coeficientes de regresión lineal obtenidos variaron entre 0.9942 y 0.9976 para todas las especies, con lo que en el rango de concentración empleado, los

parámetros experimentales se pueden considerar óptimos. Tampoco se observaron cambios significativos en el valor $\delta^{13}\text{C}$ en función de la concentración de las especies, ni fraccionamiento al añadir cantidades crecientes de derivatizante. Por tanto, parece que la metodología desarrollada es suficientemente robusta en las condiciones experimentales estudiadas. Es importante destacar que la señal obtenida en función de los ng de C del compuesto es prácticamente equivalente entre los compuestos de Hg etilados y los BTEX (Figura E.14).

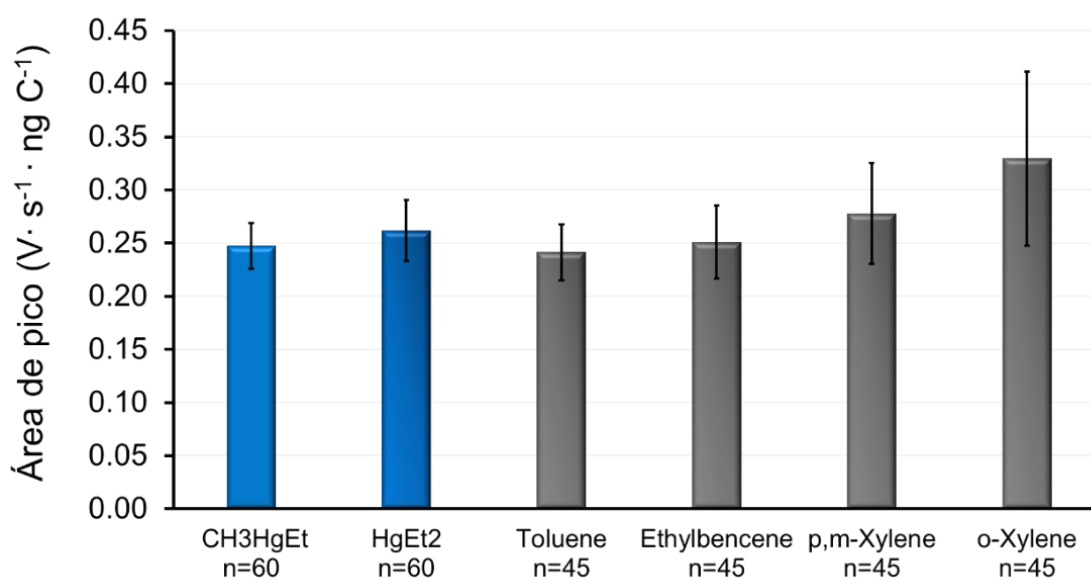


Figura E.14. Área de pico por ng C para cada cada compuesto etilado de Hg(II) y MeHg (azul) y para cada compuesto orgánico BTEX (gris).

El valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ se obtuvo a través de una corrección matemática, empleando como estándar interno el Hg(II). Con esto se eliminó la contribución de los C aportados por el derivatizante $\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$. Se ha demostrado que el Hg(II) no sólo sirve para realizar la corrección matemática, sino que también corrige las transformaciones que pudiesen experimentar los átomos de C. De acuerdo a estos datos, se obtuvieron valores de referencia para cada uno de los patrones empleados, como se muestra en la Figura E.15. El valor de $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ de consenso ($-53.5 \pm 1.9 \text{ ‰}$, $n=71$), se corresponde con el valor previamente publicado para una disolución preparada a partir de la misma sal de MeHg ($-53.8 \pm 1.1 \text{ ‰}$).²⁸⁶

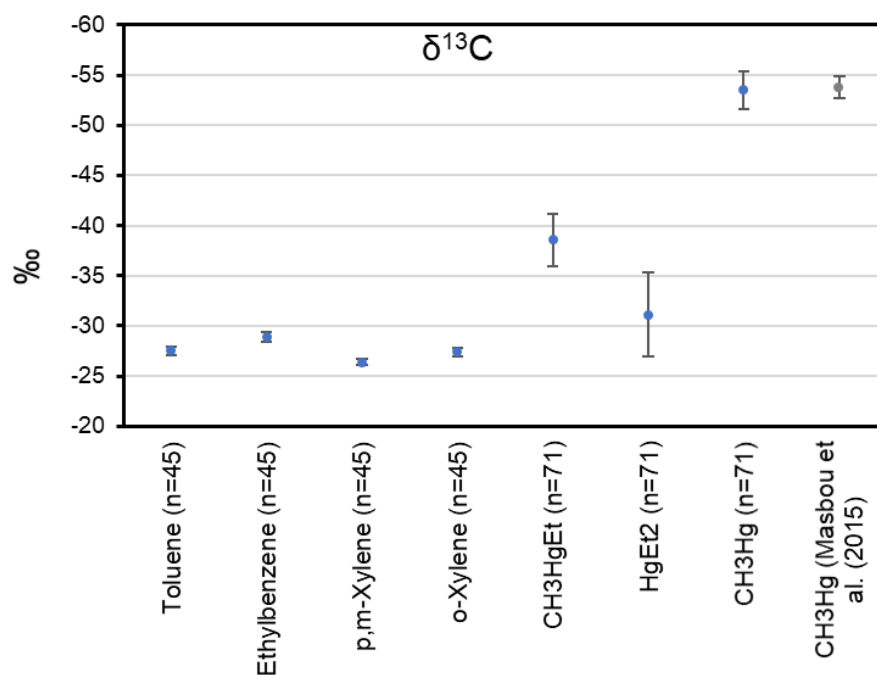


Figura E.15. Valores $\delta^{13}\text{C}$ obtenidos para los diferentes compuestos (azul) y comparación del $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ de consenso, con el valor obtenido en un trabajo previo²⁸⁶ por inyección líquida (gris).

Este trabajo demuestra la aplicación de un sistema de Purga y Trampa acoplado a un GC-C-IRMS para medir $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$. La medida simultánea de Hg(II), como estándar interno, también permite la corrección de la contribución de carbono del reactivo de derivación, así como la mejora de la precisión en la medida. La comparación de los valores de $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ obtenidos para la misma solución estándar en este estudio con un trabajo anterior, también demuestra que el sistema de PT no fracciona los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los compuestos de mercurio etilados. El empleo de BTEX como un estándar secundario a lo largo de las medidas, ha permitido verificar la eficiencia de la transferencia de las especies de Hg. Por lo tanto, la metodología desarrollada aquí permite obtener información con precisión y exactitud para explorar y comprender el significado de la huella isotópica de carbono del CH₃Hg. Además, la versatilidad de este sistema hace posible su acoplamiento a un equipo GC-ICP-MS y GC-MC-ICP para la medida de relaciones isotópicas de Hg. Este trabajo es junto con un trabajo previo por inyección líquida-GC-IRMS pionero en este campo de estudio, con lo que presenta diversas dificultades a la hora del desarrollo de la metodología. En nuestro caso el empleo de un sistema de Purga y Trampa conectado al GC-IRMS ha reducido drásticamente la cantidad de muestra requerida en el análisis, logrando una mejora de 200 veces en la sensibilidad en comparación con inyección líquida-GC-C-IRMS. En

este trabajo, además de desarrollar el método experimental de análisis y medida, se ha creado un material "*in lab*" para validar posteriores medidas. En el caso de $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ es necesario el desarrollo de un método de extracción selectiva de MeHg, como se ha realizado en este trabajo.³³² Aunque , ya que todo el C incorporado al Hg(II) procede del derivatizante, también podría evaluarse el empleo del propio Hg(II) endógeno en la muestra como estándar interno.

A través del desarrollo de las metodologías de cuantificación y medida de relaciones isotópicas, así como la determinación de especies de Hg en las muestras humanas se ha adquirido un mayor conocimiento del comportamiento de dichas especies a nivel analítico y también en su distribución compartimental en el organismo. Las metodologías de medida de relaciones isotópicas suponen un punto de partida en el campo de la biogeoquímica de isótopos estables de Hg y su especiación.

F. Conclusiones

F1. Conclusiones (ESP)

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral consistió en el Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de la concentración y el fraccionamiento isotópico de especies de mercurio en muestras biológicas mediante el acoplamiento de la Cromatografía de Gases a distintos espectrómetros de masas. Las conclusiones extraídas a partir de los resultados obtenidos en los diferentes capítulos de esta Tesis se pueden resumir en los siguientes puntos:

- Se ha demostrado que la determinación exacta y precisa de MeHg, EtHg y Hg(II) en muestras humanas, requiere el empleo de IDMS específica de la especie con trazador isotópico triple. Esto se debe a que para todas las matrices analizadas en cualquiera de las condiciones de preparación de muestra empleadas, se observaron importantes conversiones de MeHg y EtHg en Hg(II). Dichas conversiones no pueden corregirse mediante ninguna otra técnica de calibración, ni siquiera utilizando una estrategia IDMS de trazador isotópico sencillo. También se ha demostrado una importante discrepancia entre las conversiones observadas durante el análisis del material de referencia certificado SRM 955c y las observadas en las muestras de sangre real. Las especies de Hg en muestras reales están asociadas de manera endógena a proteínas u otros componentes de la matriz, mientras que el material SRM 955c es una muestra de sangre de cabra fortificada. Además Se ha demostrado también que la cantidad de reactivo derivatizante, NaBPr₄, condiciona en gran medida el grado de interconversión de las especies y debe optimizarse específicamente para cada tipo de matriz. De hecho, se ha observado una relación directa entre la cantidad agregada a la muestra y la transformación de EtHg y MeHg en Hg(II) en todas las matrices. Además, al utilizar un exceso de NaBPr₄, se ha evidenciado la reducción completa de las especies de Hg en Hg(0).
- Se ha llevado a cabo en colaboración con el Instituto Nacional de Metrología de EEUU (NIST) la certificación de las fracciones de masa (expresadas como $\mu\text{g kg}^{-1}$ de Hg o Sn) de HgT, MeHg, Hg(II), MBT, DBT y TBT en el material de referencia SRM 1974c (tejido de

mejillón congelado fresco). La metodología empleada para la determinación de especies de Sn se basó en IDMS con trazador isotópico sencillo mientras que para la determinación de las especies de Hg se aplicó dilución isotópica con doble trazador, lo cual permitió corregir las transformaciones entre las especies durante las distintas etapas analíticas. La complejidad de estos análisis se debió al bajo nivel de concentración de las especies organometálicas de Sn y Hg en las muestras...

- Se demostró mediante LA-ICP-MS que la relación $^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$ confirma la evidencia de adsorción externa de $\text{Hg}(0)_v$ en el pelo humano. El estudio de la adsorción de $\text{Hg}(0)_v$ al pelo humano tras una exposición ocupacional demostró que las concentraciones de mercurio en el pelo pueden ser hasta 1000 veces más altas que el mercurio que entra en el cabello como consecuencia de la ingestión o la absorción pulmonar. Se demostró también que mediante el análisis longitudinal del pelo mediante LA-ICP-MS se puede elucidar la fecha de una intoxicación ocupacional teniendo en cuenta valores normales de crecimiento del pelo. Análisis de las muestras complementarios por GC-ICP-MS confirmaron que el mercurio adsorbido al pelo estaba en forma de $\text{Hg}(\text{II})$. Teniendo en cuenta estos resultados, las medidas del mercurio total en pelo no deben emplearse como indicador de concentración de MeHg ya que no se puede descartar la posibilidad de contaminación por adsorción directa de $\text{Hg}(0)$ ambiental.
- El estudio de los niveles de $\text{Hg}(\text{II})$, MeHg y EtHg en sangre, orina y pelo de 17 individuos altamente intoxicados por $\text{Hg}(0)$ tres años después de un accidente laboral y de sus parientes más próximos (grupo control) dio lugar a varias conclusiones. En primer lugar, las concentraciones de Hg en este grupo de individuos no discrepan de las presentadas en estudios previos para individuos en la misma región. En segundo lugar las concentraciones obtenidas en los individuos expuestos no fueron significativamente diferentes de las obtenidas en el grupo de control, a excepción del MeHg en sangre. Los resultados obtenidos sugieren que algunos de los trabajadores expuestos a $\text{Hg}(0)_v$ muestran un aumento en el nivel de MeHg en la sangre después de tres años del accidente y que no siguen los mismos mecanismos de excreción de MeHg (deposición en el pelo y desmetilación y excreción en

la orina). La hipótesis para estos datos es una removilización de MeHg o también un proceso de biometilación para explicar esos niveles anormales de MeHg en la sangre.

- Se ha desarrollado una metodología para la medida de relaciones isotópicas de especies de mercurio con elevada exactitud y precisión mediante GC-MC-ICPMS. La instrumentación y los parámetros experimentales empleados demostraron que utilizando señales transientes estrechas típicas de cromatografía de gases, se obtenía el mismo nivel de exactitud y precisión en los valores delta específicos de Hg (II) que los obtenidos en trabajos previos con picos más anchos y programas de GC más largos. . La medida de las relaciones de isótopos en señales transientes estrechas proporciona dos ventajas: menor tiempo de análisis y mejora de la resolución cromatográfica en la separación de MeHg y Hg(II).
- Se ha desarrollado un método de alta sensibilidad para la medida de relaciones isotópicas específicas del compuesto para el C del CH₃Hg ($\delta^{13}\text{CCH}_3\text{Hg}$). Para ello se ha puesto a punto un sistema de Purga y Trampa acoplado a un GC-C-IRMS (PT-GC-C-IRMS). Con este sistema se logró una mejora de 200 veces en la sensibilidad en comparación con inyección líquida en GC-C-IRMS. La medida simultánea de Hg(II), como estándar interno, también permite la corrección de la contribución de carbono del derivatizante, así como la mejora de la precisión. La comparación de los valores de $\delta^{13}\text{CCH}_3\text{Hg}$ obtenidos para una disolución estándar de la misma sal que un trabajo anterior, demuestra que el sistema de Purga y Trampa no fracciona los valores de $\delta^{13}\text{C}$ de los compuestos de Hg etilados. El empleo de BTEX como un estándar secundario a lo largo de las medidas permite verificar la eficiencia de la transferencia de las especies de Hg.

F2. Conclusions (ENG)

The general objective of this Thesis was the development of analytical methodologies for the determination of the concentration and the isotopic fractionation of mercury species in biological samples by coupling Gas Chromatography to different mass spectrometers. Several main conclusions could be obtained from this work and are summarized as follows:

- Our results on the development of an analytical methodology for Hg speciation in human samples demonstrate that the accurate and precise determination of MeHg, EtHg and Hg(II) such complex matrices requires the use of triple spiking species-specific IDMS. In all analysed samples under all sample preparation conditions we observed important conversions of MeHg and EtHg into Hg(II). These interconversions can not be corrected by any other calibration technique including single spiking species-specific IDMS. The Hg species in real samples are endogenously associated with proteins or other components of the matrix, whereas SRM 955c is a fortified caprine blood. In addition, a different interconversion extent was found for each real blood sample applying the same sample preparation conditions. The amount of NaBPr₄ significantly affects the interconversion extent so it must be specifically optimized for each type of matrix. In fact, a direct relationship has been observed in all matrices between the amount of NaBPr₄ added to the sample and the conversion extent of EtHg and MeHg into Hg(II). Also, when an excess of NaBPr₄ was added, a complete reduction of all Hg species to Hg(0) was observed.
- The certification of the mass fractions (expressed as $\mu\text{g kg}^{-1}$ of Hg or Sn) of HgT, MeHg, Hg(II), MBT, DBT y TBT in the reference material SRM 1974c (fresh frozen mussel tissue). Has been carried out in collaboration with NIST. Single spiking species-specific IDMS was applied for the determination of butyltin compounds and double spiking IDMS was applied for the determination of Hg species in the reference material allowing the correction of species conversion. The complexity of these analyses was mainly due to the extremely low concentration levels of the organometallic species in the sample.

- Using LA-ICP-MS we could demonstrate that the $^{202}\text{Hg}/^{34}\text{S}$ ratio confirms the evidence of external adsorption of $\text{Hg}(0)$ in human hair. The study of $\text{Hg}(0)$ adsorption to human hair after an occupational exposure revealed that mercury concentrations in human hair can be up to 1000-fold higher than the mercury which does go into the hair as a consequence of ingestion or lung absorption. It was demonstrated that the longitudinal analyses of hair samples by LA-ICP-MS is a valuable tool to establish the date of an occupational exposure. Complimentary GC-ICP-MS analyses of hair samples showed that Hg was adsorbed to hair as $\text{Hg}(\text{II})$. These results show that the measurement of total mercury in hair as an indicator of MeHg concentration can lead to erroneous results, since the direct adsorption of environmental $\text{Hg}(0)$ can not be ruled out.
- The study of the levels of $\text{Hg}(\text{II})$, MeHg and EtHg in blood, urine and hair of 17 three years after a severe exposition to $\text{Hg}(0)$ and a control group formed by their close relatives led to several conclusions. First, Hg concentrations in exposed individuals were similar to those obtained in previous studies in the same region. Secondly, similar concentrations between the exposed individuals and the control group were obtained except for MeHg in blood. Our results show an increase of MeHg in blood in exposed individuals who had completely removed fish from their diet. These observations suggest that these individuals do not follow the same mechanisms of excretion of MeHg (deposition in the hair and demethylation) and excretion in the urine. The hypothesis to explain these abnormal levels of MeHg in the blood is a remobilization of MeHg or a biomethylation process.
- A methodology has been developed for the accurate and precise measurement of $\text{Hg}(\text{II})$ -specific isotope ratios by GC-MC-ICPMS. Using the optimized experimental parameters, it was demonstrated that the level of accuracy and precision obtained with narrow transient signals (regular GC peaks) is similar to that obtained when working with wider transient signals. The measurement of isotope ratios in narrow transient signals provides two important advantages when analyzing real samples. First, the analysis time per sample is reduced and secondly, a better chromatographic resolution is obtained. This is particularly

important to avoid errors in the measurement of species-specific isotopic compositions when analyzing real samples.

- A high sensitivity method was developed for the measurement of compound specific isotopic ratios for the C of CH₃Hg ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$). The developed Purge and Trap system coupled to a GC-C-IRMS (PT-GC-C-IRMS) provided a 200-fold improvement in sensitivity compared to liquid injection in GC-C-IRMS. The simultaneous measurement of Hg(II), as an internal standard allowed the correction of the carbon contribution of the derivatization reagent, as well as an improvement of the accuracy. The comparison of the values of $\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_3\text{Hg}}$ obtained for a standard solution of the same salt in a previous work, demonstrated that the Purge and Trap system does not fractionate the C isotopes according to $\delta^{13}\text{C}$ values of the ethylated Hg compounds. The use of BTEX as a secondary standard throughout the measurements demonstrated the efficiency of the transfer of derivatized Hg species.

G. Factor de impacto

G.1. Factor de impacto de las publicaciones presentadas.

El trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral ha sido publicado en revistas científicas internacionales indexadas en el JCR (Journal Citation Report), y la mayoría dentro del primer cuartil de su categoría. A continuación, se detallan los datos de factor de impacto y categoría de las revistas en las que se pueden encontrar las publicaciones de la presente Tesis Doctoral.

- El **Artículo Científico I** se ha publicado en la revista “Analytical Chemistry”, con factor de impacto 6.042 (2017) y perteneciente al primer cuartil en la categoría de Química Analítica (puesto 4 de 81).
- El **Artículo Científico II** se ha enviado a la revista “Analytical and Bioanalytical Chemistry”
- El **Artículo Científico III** se ha publicado en la revista “Journal of Trace Elements in Medicine and Biology”, con factor de impacto 3.755 (2017) y perteneciente al segundo cuartil en la categoría de Bioquímica y Biología Molecular (puesto 88 de 293), y en la categoría de Endocrinología y Metabolismo (puesto 44 de 142).
- El **Artículo Científico IV** se ha publicado en la revista “Science of the Total Environment”, con factor de impacto 4.610 (2017) y perteneciente al primer cuartil en la categoría de Ciencias Medioambientales (puesto 27 de 242).
- El **Artículo Científico V** se ha publicado en la revista “Journal of Analytical Atomic Spectrometry”, con factor de impacto 3.608 (2017) y perteneciente al primer cuartil en la categoría de Química Analítica (puesto 14 de 81).
- El **Artículo Científico VI** se ha enviado a la revista “Journal of Chromatography A”.

H. Referencias bibliográficas

- (1) Hylander, L. D.; Meili, M. 500 Years of Mercury Production: Global Annual Inventory by Region until 2000 and Associated Emissions. *Sci. Total Environ.* 2003, 304 (1–3), 13–27.
- (2) Hernández-Sobrino, Á. *Los Mineros Del Azogue*; Fundación Almadén: Ciudad Real, España, 2008.
- (3) Caley, E. R.; Ohio, C. Mercury and Its Compounds in Ancient Times. *J. Chem. Educ.* 1928, 5 (4), 419–424.
- (4) Asano, S.; Eto, K.; Kurisaki, E.; Gunji, H.; Hiraiwa, K.; Sato, M.; Sato, H.; Hasuike, M.; Hagiwara, N.; Wakasa, H. Acute Inorganic Mercury Vapor Inhalation Poisoning. *Pathol. Int.* 2000, 50, 169–174.
- (5) Molina, L. Sobre El Estanque de Mercurio de Medina Azahara. *Al-Qantara - Rev. CSIC* 2004, XXV (2), 329–333.
- (6) Wisniak, J. The History of Mercury. From Discovery to Incommodity. *Rev. CENIC Ciencias Quim.* 2008, 39 (3), 147–157.
- (7) Xingzhong, W. Tourist Geography of Xi'an. *GeoJournal* 1990, 21, 147–153.
- (8) Toulmin, S. E. Crucial Experiments: Priestley and Lavoisier. *J. Hist. Ideas* 1957, 18 (2), 205–220.
- (9) Goldwater, L. J. *Mercury. A History of Quicksilver*; York Press: Baltimore (USA), 1972.
- (10) Cooke, C. A.; Hintelmann, H.; Ague, J. J.; Burger, R.; Biester, H.; Sachs, J. P.; Engstrom, D. R. Use and Legacy of Mercury in the Andes. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47 (9), 4181–4188.
- (11) Wang, J.; Wang, J. Vermilion Pigments in Ancient China. *Wenwu bachu yu kaogu kexue* 1999, 11 (1), 39–44.
- (12) Clarkson, T. W. The Toxicology of Mercury. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 1997, 34 (3), 369–403.
- (13) Nöller, R. Cinnabar Reviewed: Characterization of the Red Pigment and Its Reactions. *Int. Inst. Conserv. Hist. Artist. Work.* 2013, 0, 1–9.
- (14) Herrera, L. K.; Duran, A.; Franquelo, M. L.; Jimenez de Haro, M. C.; Justo Erbez, A.; Perez-Rodriguez, J. L. Studies of Deterioration of the Tin-Mercury Alloy within Ancient Spanish Mirrors. *J. Cult. Herit.* 2008, 9, e41–e46.
- (15) Parsons, M. B.; Percival, J. B. A Brief History of Mercury and Its Environmental Impact. In *Mercury: Sources, measurements, cycles and effects*; Parsons, M. B., Percival, J. B., Eds.; Mineralogical Association of Canada, 2005.
- (16) Nabi, S. *Toxic Effects of Mercury*; Springer India: New Delhi, 2014.
- (17) Clarkson, T. W. The Three Modern Faces of Mercury. *Environ. Health Perspect.* 2002, 110, 11–23.
- (18) Bakir, F.; Damluji, S. F.; Amin-Zaki, L.; Murtadha, M.; Khalidi, A.; Al-Rawi, N. Y.; Tikriti, S.; Dahahir, H. I.; Clarkson, T. W.; Smith, J. C.; et al. Methylmercury Poisoning in Iraq. *Science* (80-). 1973, 181, 230–241.
- (19) U.S. Environmental Protection Agency (EPA). *Fate and Transport of Mercury in the Environment*; 1997; Vol. III.
- (20) Slemr, F.; Schuster, G.; Seiler, W. Distribution, Speciation, and Budget of Atmospheric Mercury. *J. Atmos. Chem.* 1985, 3 (4), 407–434.
- (21) Schroeder, W. H.; Yarwood, G.; Niki, H. Transformation Processes Involving Mercury Species in the Atmosphere - Resulta Froma Literature Survey. *Water. Air. Soil Pollut.* 1991, 56, 653–654.
- (22) Lindqvist, O.; Rodhe, H. Atmospheric Mercury-a Review. *Tellus* 1985, 37B, 136–159.
- (23) Nriagu, J. O. Mercury Pollution from the Past Mining of Gold and Silver in the Americas. *Sci. Total Environ.* 1994, 149, 167–181.
- (24) Habashi, F. Mercury, Physical and Chemical Properties. In *Encyclopedia of Metalloproteins*; Kretsinger, R. H., Uversky, V. N., Permyakov, E. A., Eds.; Springer: New York, 2013.
- (25) Cohen, E. R.; Cvitas, T.; Frey, J. G.; Holmström, B.; Kuchitsu, K.; Marquardt, R.; Mills, I.; Pavese, F.; Quack, M.; Stohner, J.; et al. Quantities, Units and Symbols in Physical Chemistry. In *IUPAC Green Book*; IUPAC & RSC Publishing: Cambridge, 2008.

- (26) Wedepohl, K. H. The Composition of the Continental Crust. *Geochim. Cosmochim. Acta* 1995, 59 (7), 1217–1232.
- (27) Bjørklund, G.; Dadar, M.; Mutter, J.; Aaseth, J. The Toxicology of Mercury: Current Research and Emerging Trends. *Environ. Res.* 2017, 159, 545–554.
- (28) Lin, C.; Pehkonen, S. O. The Chemistry of Atmospheric Mercury : A Review. 2000, 33 (May 1998).
- (29) Sander, R. Compilation of Henry's Law Constants (Version 4.0) for Water as Solvent. *Atmos. Chem. Phys.* 2015, 15, 4399–4981.
- (30) Lindberg, S. E.; Stratton, W. J. Atmospheric Mercury Speciation : Concentrations and Behavior of Reactive Gaseous Mercury in Ambient Air. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 32 (1), 49–57.
- (31) OSPAR, C. Methoxychlor. In *Hazardous Substances Series*; 2002.
- (32) Bharti, R.; Wadhvani, K.; Tikku, A.; Chandra, A. Dental Amalgam: An Update. *J. Conserv. Dent.* 2010, 13 (4), 204.
- (33) Dórea, J. G.; Farina, M.; Rocha, J. B. T. Toxicity of Ethylmercury (and Thimerosal): A Comparison with Methylmercury. *J. Appl. Toxicol.* 2013, 33 (8), 700–711.
- (34) U.S. Geological Survey. *Mineral Commodity Summaries 2013*; 2013.
- (35) United Nations Environmental Programme. *Mercury-Containing Products Partnership Area*; 2013.
- (36) Pacyna, J. M.; Travnikov, O.; Simone, F. De; Hedgecock, I. M.; Sundseth, K.; Pacyna, E. G.; Steenhuisen, F.; Pirrone, N.; Munthe, J.; Kindbom, K. Current and Future Levels of Mercury Atmospheric Pollution on a Global Scale. *Atmos. Chem. Phys.* 2016, 16 (19), 12495–12511.
- (37) Pirrone, N.; Cinnirella, S.; Feng, X.; Finkelman, R. B.; Friedli, H. R.; Leaner, J.; Mason, R.; Mukherjee, a. B.; Stracher, G. B.; Streets, D. G.; et al. Global Mercury Emissions to the Atmosphere from Anthropogenic and Natural Sources. *Atmos. Chem. Phys.* 2010, 10 (13), 5951–5964.
- (38) United Nations Environmental Programme. *Mercury-Time to Act*. In *PNUMA Global Mercury Assessment*; 2013; pp 1–42.
- (39) Sundseth, K.; Pacyna, J. M.; Pacyna, E. G.; Pirrone, N.; Thorne, R. J. Global Sources and Pathways of Mercury in the Context of Human Health. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2017, 14 (105), 1–14.
- (40) Mason, R. P.; Choi, A. L.; Fitzgerald, W. F.; Hammerschmidt, C. R.; Lamborg, C. H.; Soerensen, A. L.; Sunderland, E. M. Mercury Biogeochemical Cycling in the Ocean and Policy Implications. *Environ. Res.* 2012, 119, 101–117.
- (41) Selin, N. E. Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 2009, 34 (1), 43–63.
- (42) Engstrom, D. R. Fish Respond When the Mercury Rises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2007, 104 (42), 16394–16395.
- (43) Amyot, M.; Gill, G. A.; Morel, F. M. M. Production and Loss of Dissolved Gaseous Mercury in the Coastal Waters of the Gulf of Mexico. *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31 (12), 3606.
- (44) Horowitz, H. M.; Jacob, D. J.; Zhang, Y.; Dibble, T. S.; Slemr, F.; Amos, H. M.; Schmidt, J. A.; Corbitt, E. S.; Marais, E. A.; Sunderland, E. M. A New Mechanism for Atmospheric Mercury Redox Chemistry: Implications for the Global Mercury Budget. *Atmos. Chem. Phys.* 2017, 17 (10), 6353–6371.
- (45) Saiz-Lopez, A.; Sitkiewicz, S. P.; Roca-Sanjuán, D.; Oliva-Enrich, J. M.; Dávalos, J. Z.; Notario, R.; Jiskra, M.; Xu, Y.; Wang, F.; Thackray, C. P.; et al. Photoreduction of Gaseous Oxidized Mercury Changes Global Atmospheric Mercury Speciation, Transport and Deposition. *Nature* 2018, 9, 1–9.
- (46) Wigfield, D. C.; Perkins, S. L. Oxidation of Elemental Mercury by Hydroperoxides in Aqueous Solution. *Can. J. Chem.* 1985, 63, 275–277.
- (47) Skjllberg, U.; Qian, J.; Frech, W.; Xia, K.; Bleam, W. F. Distribution of Mercury, Methyl Mercury and Organic Sulphur Species in Soil, Soil Solution and Stream of a Boreal Forest Catchment. *Biogeochemistry* 2003, 64 (1), 53–76.
- (48) Munthe, J.; Xiao, Z. F.; Lindqvist, O. The Aqueous Reduction of Divalent Mercury by Sulfite. *Water*,

- Air, Soil Pollut. 1991, 56 (1), 621–630.
- (49) Pehkonen, S. O.; Lin, C.-J. Aqueous Photochemistry of Mercury with Organic Acids. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 1998, 48 (2), 144–150.
- (50) Si, L.; Ariya, P. A. Recent Advances in Atmospheric Chemistry of Mercury. *Atmosphere (Basel)*. 2018, 9 (76), 1–18.
- (51) Munthe, J. The Aqueous Oxidation of Elemental Mercury by Ozone. *Atmos. Environ. Part A, Gen. Top.* 1992, 26 (8), 1461–1468.
- (52) Fitzgerald, W. F.; Lamborg, C. H.; Hammerschmidt, C. R. Marine Biogeochemical Cycling of Mercury. *Chem. Rev.* 2007, 107 (2), 641–662.
- (53) Mason, R. P. The Methylation of Metals and Metalloids in Aquatic Systems. In *Methylation- From DNA, RNA and Histones to Diseases and Treatment*; Intech, 2013; pp 271–301.
- (54) Compeau, G. C.; Bartha, R. Sulfate-Reducing Bacteria: Principal Methylators of Mercury in Anoxic Estuarine Sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 1985, 50 (2), 498–502.
- (55) Sunderland, E. M.; Krabbenhoft, D. P.; Moreau, J. W.; Strode, S. A.; Landing, W. M. Mercury Sources, Distribution, and Bioavailability in the North Pacific Ocean: Insights from Data and Models. *Global Biogeochem. Cycles* 2009, 23, 1–14.
- (56) Kaschak, E.; Knopf, B.; Petersen, J. H.; Bings, N. H.; König, H. Biotic Methylation of Mercury by Intestinal and Sulfate-Reducing Bacteria and Their Potential Role in Mercury Accumulation in the Tissue of the Soil-Living *Eisenia Foetida*. *Soil Biol. Biochem.* 2013, 69, 1–10.
- (57) Weber, J. H. Review of Possible Paths for Abiotic Methylation of Mercury(II) in the Aquatic Environment. *Chemosphere* 1993, 26 (11), 2063–2077.
- (58) Parks, J. M.; Johns Alexander; Podar, M.; Bridou, R.; Hurt, R. A.; Smith, S. D.; Tomanicek, S. J.; Qian, Y.; Brown, S. D.; Brandt, C. C.; et al. The Genetic Basis for Bacterial Mercury Methylation. *Science (80-)*. 2013, 339 (6125), 1332–1335.
- (59) Smith, S. D.; Bridou, R.; Johns, A.; Parks, J. M.; Elias, D. A.; Hurt, R. A.; Brown, S. D.; Podar, M.; Wall, J. D. Site-Directed Mutagenesis of HgcA and HgcB Reveals Amino Acid Residues Important for Mercury Methylation. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81 (9), 3205–3217.
- (60) Gilmour, C. C.; Podar, M.; Bullock, A. L.; Graham, A. M.; Brown, S. D.; Somenahally, A. C.; Johns, A.; Hurt, R. A.; Bailey, K. L.; Elias, D. A. Mercury Methylation by Novel Microorganisms from New Environments. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47, 11810–11820.
- (61) Gilmour, C. C.; Bullock, A. L.; Mckburney, A.; Podar, M.; Elias, D. A. Crossm Robust Mercury Methylation across Diverse Methanogenic Archaea. *Am. Soc. Microbiol.* 2018, 9 (2), 1–13.
- (62) Feng, X.; Li, P.; Qiu, G.; Wang, S.; Li, G.; Shang, L.; Meng, B.; Jiang, H.; Bai, W.; Li, Z.; et al. Human Exposure to Methylmercury through Rice Intake in Mercury Mining Areas, Guizhou Province, China. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42 (1), 326–332.
- (63) Sellers, P.; Kelly, C. A.; Rudd, J. W. M.; MacHutchon, A. R. Photodegradation of Methylmercury in Lakes. *Nature* 1996, 380, 694–695.
- (64) Hammerschmidt, C. R.; Fitzgerald, W. F. Iron-Mediated Photochemical Decomposition of Methylmercury in an Arctic Alaskan Lake. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44, 6138–6143.
- (65) Oremland, R. S.; Culbertson, C. W.; Winfrey, M. R. Methylmercury Decomposition in Sediments and Bacterial Cultures: Involvement of Methanogens and Sulfate Reducers in Oxidative Demethylation. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, 57 (1), 130–137.
- (66) Klapstein, S. J.; Ziegler, S. E.; Driscoll, N. J. O. Methylmercury Photodemethylation Is Inhibited in Lakes with High Dissolved Organic Matter. *Environ. Pollut.* 2018, 232, 392–401.
- (67) Mason, R. P.; Reinfelder, J. R.; Morel, F. M. M. Bioaccumulation of Mercury and Methylmercury. *Water, Air, Soil Pollut.* 1995, 80, 915–921.
- (68) Driscoll, C. T.; Mason, R. P.; Chan, H. M.; Jacob, D. J.; Pirrone, N. Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47, 4967–4983.
- (69) Jonsson, S.; Andersson, A.; Nilsson, M. B.; Skyllberg, U.; Lundberg, E.; Schaefer, J. K.; Åkerblom, S.; Björn, E. Terrestrial Discharges Mediate Trophic Shifts and Enhance Methylmercury

- Accumulation in Estuarine Biota. *Sci. Adv.* 2017, 3, 1–9.
- (70) Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C.; Tessier, E.; Amouroux, D.; Guyoneaud, R.; Duran, R.; Caumette, P.; Donard, O. F. X. Mercury Methylation/Demethylation and Volatilization Pathways in Estuarine Sediment Slurries Using Species-Specific Enriched Stable Isotopes. *Mar. Chem.* 2004, 90, 107–123.
- (71) Clarkson, T. W.; Vyas, J. B.; Ballatori, N. Mechanisms of Mercury Disposition in the Body. *Am. J. Ind. Med.* 2007, 50, 757–764.
- (72) Nuttall, K. L. Review : Interpreting Mercury in Blood and Urine of Individual Patients. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2004, 34 (3), 235–250.
- (73) Sandborgh-Englund, G.; Elinder, C. G.; Langworth, S.; Schütz, A.; Ekstrand, J. Mercury in Biological Fluids after Amalgam Removal. *J. Dent. Res.* 1998, 77 (4), 615–624.
- (74) European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the Risk for Public Health Related to the Presence of Mercury and Methylmercury in Food; 2012; Vol. 10.
- (75) Gochfeld, M. Cases of Mercury Exposure, Bioavailability, and Absorption. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2003, 56 (1), 174–179.
- (76) Clements, C. J.; Ball, L. K.; Ball, R.; Pratt, D. Thiomersal in Vaccines. *Lancet* 2000, 355, 1279–1280.
- (77) Trümppler, S.; Meermann, B.; Nowak, S.; Buscher, W.; Karst, U.; Sperling, M. In Vitro Study of Thimerosal Reactions in Human Whole Blood and Plasma Surrogate Samples. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2014, 28 (2), 125–130.
- (78) Pedrero Zayas, Z.; Ouerdane, L.; Mounicou, S.; Lobinski, R.; Monperrus, M.; Amouroux, D. Hemoglobin as a Major Binding Protein for Methylmercury in White-Sided Dolphin Liver. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 406 (4), 1121–1129.
- (79) Bridges, C. C.; Zalups, R. K. Mechanisms Involved in the Transport of Mercuric Ions in Target Tissues. *Arch. Toxicol.* 2016, 91, 63.
- (80) Zimmermann, L. T.; Santos, D. B.; Naime, A. A.; Leal, R. B.; Dórea, J. G.; Barbosa, F.; Aschner, M.; Rocha, J. B. T.; Farina, M. Comparative Study on Methyl- and Ethylmercury-Induced Toxicity in C6 Glioma Cells and the Potential Role of LAT-1 in Mediating Mercurial-Thiol Complexes Uptake. *Neurotoxicology* 2013, 38, 1–8.
- (81) Burbacher, T. M.; Shen, D. D.; Liberato, N.; Grant, K. S.; Cernichiari, E.; Clarkson, T. W. Comparison of Blood and Brain Mercury Levels in Infant Monkeys Exposed to Methylmercury or Vaccines Containing Thimerosal. *Environ. Health Perspect.* 2005, 113 (8), 1015–1021.
- (82) Halbach, S.; Clarkson, T. W. Enzymatic Oxidation of Mercury Vapor by Erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1978, 523, 522–531.
- (83) Magos, L.; Halbach, S.; Clarkson, T. W. Role of Catalase in the Oxidation of Mercury Vapor. *Biochem. Pharmacol.* 1978, 27 (9), 1373–1377.
- (84) Berlin, M.; Zalups, R. K.; Fowler, B. A. Mercury. In *Handbook on the Toxicology of Metals, Specific Metals II*; 2015; pp 1013–1075.
- (85) Cardiano, P.; Falcone, G.; Foti, C.; Sammartano, S. Sequestration of Hg 2+ by Some Biologically Important Thiols. *J. Chem. Eng. Data* 2011, 56 (12), 4741–4750.
- (86) Cuvín-Aralar, M. L. A.; Furness, R. W. Mercury and Selenium Interaction: A Review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1991, 21 (3), 348–364.
- (87) García-Sevillano, M. A.; Rodríguez-Moro, G.; García-Barrera, T.; Navarro, F.; Gómez-Ariza, J. L. Biological Interactions between Mercury and Selenium in Distribution and Detoxification Processes in Mice under Controlled Exposure. Effects on Selenoprotein. *Chem. Biol. Interact.* 2015, 229, 82–90.
- (88) Chen, C.; Yu, H.; Zhao, J.; Li, B.; Qu, L.; Liu, S.; Zhang, P.; Chai, Z. The Roles of Serum Selenium and Selenoproteins on Mercury Toxicity in Environmental and Occupational Exposure. 2006, 114 (2), 297–301.
- (89) Steinbrenner, H.; Sies, H. Protection against Reactive Oxygen Species by Selenoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2009, 1790, 1478–1485.
-

- (90) Sherman, L. S.; Blum, J. D.; Franzblau, A.; Basu, N. New Insight into Biomarkers of Human Mercury Exposure Using Naturally Occurring Mercury Stable Isotopes. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47 (7), 3403–3409.
- (91) Clarkson, T. W.; Magos, L. The Toxicology of Mercury and Its Chemical Compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 2006, 36 (8), 609–662.
- (92) Heintze, U.; Edwardsson, S.; Dérand, T.; Birkhed, D. Methylation of Mercury from Dental Amalgam and Mercuric Chloride by Oral Streptococci in Vitro. *Eur. J. Oral Sci.* 1983, 91 (2), 150–152.
- (93) Leistevuo, J.; Leistevuo, T.; Helenius, H.; Pyy, L.; Österblad, M.; Huovinen, P.; Tenovuo, J. Dental Amalgam Fillings and the Amount of Organic Mercury in Human Saliva. *Caries Res.* 2001, 35 (3), 163–166.
- (94) Rowland, I. R. The Interaction of the Gut Flora with Metal Compounds. In *Role of gut bacteria in human toxicology and pharmacology*; Hill, M. J., Ed.; Taylor & Francis: Slough, UK, 1995.
- (95) Rowland, I.; Davies, M.; Grasso, P. Biosynthesis of Methylmercury Compounds by the Intestinal Flora of the Rat. *Arch. Environ. Health* 1977, 32, 24–28.
- (96) Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C.; Mateo, R.; Jiménez-Moreno, M. Is Gastrointestinal Microbiota Relevant for Endogenous Mercury Methylation in Terrestrial Animals? *Environ. Res.* 2017, 152, 454–461.
- (97) Podar, M.; Gilmour, C. C.; Brandt, C. C.; Soren, A.; Brown, S. D.; Crable, B. R.; Palumbo, A. V.; Somenahally, A. C.; Elias, D. A. Global Prevalence and Distribution of Genes and Microorganisms Involved in Mercury Methylation. *Sci. Adv.* 2015, 1 (9), 1–13.
- (98) Rothenberg, S. E.; Yin, R.; Hurley, J. P.; Krabbenhoft, D. P.; Ismawati, Y.; Hong, C.; Donohue, A. Stable Mercury Isotopes in Polished Rice (*Oryza Sativa* L.) and Hair from Rice Consumers. *Environ. Sci. Technol.* 2017, 51 (11), 6480–6488.
- (99) Grandjean, P.; Weihe, P.; White, R. F.; Debes, F.; Araki, S.; Yokoyama, K.; Murata, K.; Sørensen, N.; Dahl, R.; Jørgensen, P. J. Cognitive Deficit in 7-Year-Old Children with Prenatal Exposure to Methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.* 1997, 19 (6), 417–428.
- (100) Castoldi, A. F.; Coccini, T.; Ceccatelli, S.; Manzo, L. Neurotoxicity and Molecular Effects of Methylmercury. *Brain Res. Bull.* 2001, 55 (2), 197–203.
- (101) Miura, K.; Imura, N. Mechanism of Methylmercury Cytotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* 1987, 18 (3), 161–188.
- (102) Philbert, M. A.; Billingsley, M. L.; Reuhl, K. R. Mechanisms of Injury in the Central Nervous System. *Toxicol. Pathol.* 2000, 28 (1), 43–53.
- (103) Azevedo Fernandes, B.; Furiere Barros, L.; Peçanha, F. M.; Wiggers, G. A.; Frizera Vassallo, P.; Ronacher Sim, M.; Fiorim, J.; Rossi De Batista, P.; Fioresi, M.; Rossoni, L.; et al. Toxic Effects of Mercury on the Cardiovascular and Central Nervous Systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 2012, 1–11.
- (104) González-Estecha, M.; Bodas-Pinedo, A.; Rubio-Herrera, M. Án.; Martell-Claros, N.; Trasobares-Iglesias, E. M.; Ordóñez-Iriarte, J. M.; Guillén-Pérez, J. J.; Herráiz-Martínez, M. Án.; García-Donaire, J. A.; Farré-Rovira, R.; et al. Efectos Sobre La Salud Del Metilmercurio En Niños y Adultos; Estudios Nacionales e Internacionales. *Nutr. Hosp.* 2014, 30 (5), 989–1007.
- (105) Choi, A. L.; Weihe, P.; Budtz-Jørgensen, E.; Jørgensen, P. J.; Salonen, J. T. Methylmercury Exposure and Adverse Cardiovascular Effects in Faroese Whaling Men. 2009, 117 (3), 367–372.
- (106) Zalups, R. K. Molecular Interactions with Mercury in the Kidney. *Pharmacol. Rev.* 2000, 52 (1), 113–143.
- (107) Halbach, S.; Vogt, S.; Köhler, W.; Felgenhauer, N.; Welzl, G.; Kremers, L.; Zilker, T.; Melchart, D. Blood and Urine Mercury Levels in Adult Amalgam Patients of a Randomized Controlled Trial: Interaction of Hg Species in Erythrocytes. *Environ. Res.* 2008, 107, 69–78.
- (108) Cherian, M. G.; Clarkson, T. W. Biochemical Changes in Rat Kidney on Exposure to Elemental Mercury Vapor: Effect on Biosynthesis of Metallothionein. *Chem. Biol. Interact.* 1976, 12, 109–120.
- (109) Tokumoto, M.; Lee, J.-Y.; Shimada, A.; Tohyama, C.; Satoh, M. Glutathione Has a More Important Role than Metallothionein-I / II against Inorganic Mercury-Induced Acute Renal Toxicity. *J. Toxicol. Sci.* 2018, 43 (4), 275–280.

Referencias bibliográficas

- (110) Hogeback, J.; Schwarzer, M.; Wehe, C. A.; Sperling, M.; Karst, U. Investigating the Adduct Formation of Organic Mercury Species with Carbonic Anhydrase and Hemoglobin from Human Red Blood Cell Hemolysate by Means of LC/ESI-TOF-MS and LC/ICP-MS. *Metallomics* 2016, 8 (1), 101–107.
- (111) Ekinci, D.; Beydemir, S.; Küfrevioğlu, I. In Vitro Inhibitory Effects of Some Heavy Metals on Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2007, 22 (6), 745–750.
- (112) Antunes dos Santos, A.; Appel Hort, M.; Culbreth, M.; López-Granero, C.; Farina, M.; Rocha, J. B. T.; Aschner, M. Methylmercury and Brain Development: A Review of Recent Literature. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2017, 38, 99–107.
- (113) Takeuchi, T.; Morikawa, N.; Matsumoto, H.; Shiraishi, Y. A Pathological Study of Minamata Disease in Japan. *Acta Neuropathol.* 1962, 2, 40–57.
- (114) Vilensky, J. A.; Redman, K. British Anti-Lewisite (Dimercaprol): An Amazing History. *Ann. Emerg. Med.* 2003, 41 (3), 378–383.
- (115) George, G. N.; Prince, R. C.; Gailer, J.; Buttigieg, G. A.; Denton, M. B.; Harris, H. H.; Pickering, I. J. Mercury Binding to the Chelation Therapy Agents DMSA and DMPS and the Rational Design of Custom Chelators for Mercury. *Chem. Res. Toxicol.* 2004, 17 (8), 999–1006.
- (116) Blanusa, M.; Varnai, V.; Piasek, M.; Kostial, K. Chelators as Antidotes of Metal Toxicity: Therapeutic and Experimental Aspects. *Curr. Med. Chem.* 2005, 12 (23), 2771–2794.
- (117) Environmental Protection Agency, U. S. Mercury Study Report to Congress Volume I: Executive Summary; 1998; Vol. 1.
- (118) Chen, C. Y.; Driscoll, C. T.; Eagles-Smith, C. A.; Eckley, C. S.; Gay, D. A.; Hsu-Kim, H.; Keane, S. E.; Kirk, J. L.; Mason, R. P.; Obrist, D.; et al. A Critical Time for Mercury Science to Inform Global Policy. *Environ. Sci. Technol.* 2018, 52 (17), 9556–9561.
- (119) United Nations Environment Programme. Global Mercury Assessment; 2002.
- (120) World Health Organization; United Nations Environment Programme, U. N. E. P. Guidance for Identifying Populations At Risk From Mercury Exposure; 2008.
- (121) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, J. E. C. F. A. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. 61th Report; 2004.
- (122) Unión Europea. Comunicación de La Comisión Al Consejo y Al Parlamento Europeo. Estrategia Comunitaria Sobre El Mercurio; 2005.
- (123) Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, P. N. U. M. A. Texto Del Convenio de Minamata Sobre El Mercurio Para Su Adopción Por La Conferencia de Plenipotenciarios - Kumamoto, 2013; 2013.
- (124) Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, P. N. U. M. A. Convenio De Minamata Sobre El Mercurio; 2017.
- (125) Unión Europea. DIRECTIVA 2002/95/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 27 de Enero de 2003 Sobre Restricciones a La Utilización de Determinadas Sustancias Peligrosas En Aparatos Eléctricos y Electrónicos. D. Of. la Unión Eur. 2002, L 37 (27 de enero de 2003), 19–23.
- (126) Unión Europea. DIRECTIVA 2002/32/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 7 de Mayo de 2002 Sobre Sustancias Indeseables En La Alimentación Animal. D. Of. la Unión Eur. 2002, 140 (7 de mayo de 2002), 10–21.
- (127) Unión Europea. DIRECTIVA 2006/66/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 6 de Septiembre de 2006 Relativa a Las Pilas y Acumuladores y a Los Residuos de Pilas y Acumuladores y Por La Que Se Deroga La Directiva 91/157/CEE. D. Of. la Unión Eur. 2006, L 266 (6 de septiembre de 2006), 1–14.
- (128) Unión Europea. DIRECTIVA 2008/12/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 11 de Marzo de 2008 Por La Que Se Modifica La Directiva 2006/66/CE Relativa a Las Pilas y Acumuladores y a Los Residuos de Pilas y Acumuladores, Por Lo Que Se Refiere a Las Competencias de Ejecu. D. Of. la Unión Eur. 2008, L 76 (11 de marzo de 2008), 39–40.
- (129) Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 1223/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 30 de Noviembre de 2009 Sobre Los Productos Cosméticos. D. Of. la Unión Eur. 2009, L 342 (30 de noviembre de 2009), 59–209.
-

-
- (130) Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de Diciembre de 2006 Por El Que Se Fija El Contenido Máximo de Determinados Contaminantes En Los Productos Alimenticios. D. Of. la Unión Eur. 2006, L364 (19 de diciembre de 2006), 5–24.
- (131) Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 1102/2008 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 22 de Octubre de 2008 Relativo a La Prohibición de La Exportación de Mercurio Metálico y Ciertos Compuestos y Mezclas de Mercurio y Al Almacenamiento Seguro de Mercurio Metálico. D. Of. la Unión Eur. 2008, L 304 (22 de octubre de 2008), 75–79.
- (132) Unión Europea. Reglamento (CE) 1907/2006 Del Parlamento Europeo y Del Consejo, de 18 de Diciembre de 2006, Relativo Al Registro, La Evaluación, La Autorización y La Restricción de Las Sustancias y Preparados Químicos (REACH), Por El Que Se Crea La Agencia Europea de Sus. D. Of. la Unión Eur. 2006, L396 (18 de diciembre de 2006), 1–852.
- (133) Unión Europea. REGLAMENTO (UE) No 847/2012 DE LA COMISIÓN de 19 de Septiembre de 2012 Por El Que Se Modifica, En Lo Que Respecta Al Mercurio, El Anexo XVII Del Reglamento (CE) n o 1907/2006 Del Parlamento Europeo y Del Consejo, Relativo Al Registro, La Evaluación, La A. D. Of. la Unión Eur. 2012, L 253 (19 de septiembre de 2012), 1–4.
- (134) Unión Europea. REGLAMENTO (UE) No 848/2012 DE LA COMISIÓN de 19 de Septiembre de 2012 Por El Que Se Modifica, En Lo Que Respecta a Los Compuestos de Fenilmercurio, El Anexo XVII Del Reglamento (CE) n o 1907/2006 Del Parlamento Europeo y Del Consejo, Relativo Al Registr. D. Of. la Unión Eur. 2012, L 253 (19 de septiembre de 2012), 5–7.
- (135) Unión Europea. REGLAMENTO (UE) 2017/852 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 17 de Mayo de 2017 Sobre El Mercurio y Por El Que Se Deroga El Reglamento (CE) 1102/2008. D. Of. la Unión Eur. 2017, L 137 (17 de mayo de 2017), 137/1-137/21.
- (136) Environmental Protection Agency, U. S. A Review of the Reference Dose and Reference Concentration Processes; 2002.
- (137) Food and Drug Administration. Chemical Contaminants and Pesticides - Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. 2000, 1–11.
- (138) European Food Safety Authority. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a Request from the Commission Related to Mercury and Methylmercury in Food; 2004; Vol. 34.
- (139) Unión Europea. REGLAMENTO (CE) No 629/2008 DE LA COMISIÓN de 2 de Julio de 2008 Que Modifica El Reglamento (CE) No 1881/2006 Por El Que Se Fija El Contenido Máximo de Determinados Contaminantes En Los Productos Alimenticios. D. Of. la Unión Eur. 2008, L 173 (2 de julio de 2008), 6–9.
- (140) World Health Organization; United Nations Environment Programme, U. N. E. P. Guidance for Identifying Populations at Risk from Mercury Exposure; 2008.
- (141) Apel, P.; Angerer, J.; Wilhelm, M.; Kolossa-Gehring, M. New HBM Values for Emerging Substances, Inventory of Reference and HBM Values in Force, and Working Principles of the German Human Biomonitoring Commission. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 2017, 220, 152–166.
- (142) Siuzdak, G. An Introduction to Mass Spectrometry Ionization : An Excerpt from The Expanding Role of Mass Spectrometry. *J. Assoc. Lab. Autom.* 2005, 9 (2), 50–63.
- (143) Jakubowski, N.; Prohaska, T.; Rottmann, L.; Vanhaecke, F. Inductively Coupled Plasma- and Glow Discharge Plasma-Sector Field Mass Spectrometry Part.I. Tutorial: Fundamentals and Instrumentation. *J. Anal. At. Spectrom.* 2011, 26, 693–726.
- (144) Ammann, A. A. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP MS): A Versatile Tool. *J. Mass Spectrom.* 2007, 42, 419–427.
- (145) Bettmer, J.; Montes Bayón, M.; Ruiz Encinar, J.; Sánchez Fernández, M. L.; Fernández de la Campa, M. del R.; Sanz Medel, A. The Emerging Role of ICP-MS in Proteomic Analysis. *J. Proteomics* 2009, 72, 989–1005.
- (146) Gratuze, B. Obsidian Characterization by Laser Ablation ICP-MS and Its Application to Prehistoric Trade in the Mediterranean and the Near East : Sources and Distribution of Obsidian within the Aegen and Anatolia. *J. Archaeological Sci.* 1999, 26, 869–881.
- (147) Suzuki, K. T.; Ogra, Y. Metabolic Pathway for Selenium in the Body : Speciation by HPLC-ICP MS with Enriched Se. *Food Addit. Contam.* 2002, 19 (10), 974–983.
-

- (148) Thomas, R. A Beginner's Guide to ICP-MS Part II: The Sample-Introduction System. *Spectroscopy* 2001, 16 (5), 56–61.
- (149) Mermet, J. Fundamental Principles of Inductively Coupled Plasmas. In *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*; Hill, S. J., Ed.; Blackwell Publishing Ltd, 2007.
- (150) Farnsworth, P. B.; Spencer, R. L. Ion Sampling and Transport in ICP-MS. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 2017, 134, 105–122.
- (151) May, T. W.; Wiedmeyer, R. H. A Table of Polyatomic Interferences in ICP-MS. *At. Spectrosc.* 1998, 19 (5), 150–155.
- (152) Beauchemin, D. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2010, 82 (12), 4786–4810.
- (153) Ingle, C. P.; Sharp, B. L.; Horstwood, M. S. A.; Parrish, R. R.; Lewis, D. J. Instrument Response Functions, Mass Bias and Matrix Effects in Isotope Ratio Measurements and Semi-Quantitative Analysis by Single and Multi-Collector ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 2003, 18, 219–229.
- (154) García Alonso, J. I.; Rodríguez-González, P. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*; The Royal Society of Chemistry (RSC), 2013.
- (155) Vanhaecke, F.; Moens, L.; Dams, R. Precise Measurement of Isotope Ratios with a Double-Focusing Magnetic Sector ICP Mass Spectrometer. *Anal. Chem.* 1996, 68, 567–569.
- (156) Meija, J.; Caruso, J. A. Deconvolution of Isobaric Interferences in Mass Spectra. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004, 15, 654–658.
- (157) Meija, J.; Centineo, G.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A.; Caruso, J. A. Interpretation of Butyltin Mass Spectra Using Isotope Pattern Reconstruction for the Accurate Measurement of Isotope Ratios from Molecular Clusters. *J. Mass Spectrom.* 2005, 40, 807–814.
- (158) Paul Lee, W.-N.; Byerley, L. O.; Bergner, E. A.; Edmond, J. Mass Isotopomer Analysis: Theoretical and Practical Considerations. *Biol. Mass Spectrom.* 1991, 20, 451–458.
- (159) Moraes, M. C. B.; Neto, G. A. B.; Juliano, V. F.; Lago, C. L. do. Eliminating the Interference of M-NH Ions in Isotope Patterns from Low-Resolution Mass Spectra. *Int. J. Mass Spectrom.* 1998, 178, 129–141.
- (160) Fagerquist, C. K.; Neese, R. A.; Hellerstein, M. K. Molecular Ion Fragmentation and Its Effects on Mass Isotopomer Abundances of Fatty Acid Methyl Esters Ionized by Electron Impact. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999, 10, 430–439.
- (161) Gruber, C. C.; Oberdorfer, G.; Voss, C. V.; Kreamsner, J. M.; Kappe, C. O.; Kroutil, W. An Algorithm for the Deconvolution of Mass Spectroscopic Patterns in Isotope Labeling Studies. Evaluation for the Hydrogen - Deuterium Exchange Reaction in Ketones. *J. Organomet. Chem.* 2007, 72, 5778–5783.
- (162) Gross, J. H. *Mass Spectrometry*; Springer Berlin Heidelberg, 2004.
- (163) Wiedenbeck, M.; Bugoi, R.; Duke, M. J. M.; Dunai, T.; Enzweiler, J.; Horan, M.; Jochum, K. P.; Linge, K.; Kosler, J.; Merchel, S.; et al. GGR Biennial Critical Review: Analytical Developments Since 2010. *Geostand. geoanalytical Res.* 2012, 36 (4), 337–398.
- (164) Ruiz Encinar, J.; García Alonso, J. I.; Sanz Medel, A.; Main, S.; Turner, P. J. A Comparison between Quadrupole, Double Focusing and Multicollector ICP-MS. Part II. Evaluation of Total Combined Uncertainty in the Determination of Lead in Biological Matrices by Isotope Dilution. *J. Anal. At. Spectrom.* 2001, 16, 322–326.
- (165) Krupp, E. M.; Pécheyran, C.; Meffan-Main, S.; Donard, O. F. X. Precise Isotope-Ratio Measurements of Lead Species by Capillary Gas Chromatography Hyphenated to Hexapole Multicollector ICP – MS. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2001, 370, 573–580.
- (166) Fietzke, J.; Liebetrau, V.; Günther, D.; Gürs, K.; Hametner, K.; Zumholz, K.; Hansteen, T. H.; Eisenhauer, A. An Alternative Data Acquisition and Evaluation Strategy for Improved Isotope Ratio Precision Using LA-MC-ICP-MS Applied to Stable and Radiogenic Strontium Isotopes in Carbonates. *J. Anal. At. Spectrom.* 2008, 23 (7), 955–961.
- (167) Epov, V. N.; Bérail, S.; Jimenez-Moreno, M.; Perrot, V.; Pecheyran, C.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. Approach to Measure Isotopic Ratios in Species Using Multicollector-ICPMS Coupled with Chromatography. *Anal. Chem.* 2010, 82 (13), 5652–5662.
-

- (168) Evans, R. D.; Hintelmann, H.; Dillon, P. J. Measurement of High Precision Isotope Ratios for Mercury from Coals Using Transient Signals. *J. Anal. At. Spectrom.* 2001, 16 (9), 1064–1069.
- (169) Hirata, T.; Hayano, Y.; Ohno, T. Improvements in Precision of Isotopic Ratio Measurements Using Laser Ablation-Multiple Collector-ICP-Mass Spectrometry: Reduction of Changes in Measured Isotopic Ratios. *J. Anal. At. Spectrom.* 2003, 18, 1283–1288.
- (170) Pettke, T.; Oberli, F.; Audétat, A.; Wiechert, U.; Harris, C. R.; Heinrich, C. A. Quantification of Transient Signals in Multiple Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Accurate Lead Isotope Ratio Determination by Laser Ablation of Individual Fluid Inclusions. *J. Anal. At. Spectrom.* 2011, 26, 475–492.
- (171) Gourgiotis, A.; Bérail, S.; Louvat, P.; Isnard, H.; Moureau, J.; Nonell, A.; Manhès, G.; Birck, J. L.; Gaillardet, J.; Péchéyan, C.; et al. Method for Isotope Ratio Drift Correction by Internal Amplifier Signal Synchronization in MC-ICP-MS Transient Signals. *J. Anal. At. Spectrom.* 2014, 29 (9), 1607–1617.
- (172) Dettmer-Wilde, K.; Engewald, W. *Practical Gas Chromatography*; Dettmer-Wilde, K., Engewald, W., Eds.; Springer Heidelberg New York, 2014.
- (173) Ten Noever de Braw, M. C. Combined Gas Chromatography-Mass Spectrometry: A Powerful Tool in Analytical Chemistry. *J. Chromatogr.* 1979, 165, 207–233.
- (174) Abian, J. The Coupling of Gas and Liquid Chromatography with Mass Spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 1999, 34, 157–168.
- (175) Sparkman, O. D.; Penton, Z. E.; Kitson, F. G. The GC/MS Interface. In *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*; Academic Press Inc., 2010; pp 85–88.
- (176) Loon, J. C. Van; Alcock, L. R.; Pinchin, W. H.; French, J. B. Inductively Coupled , Plasma Source Mass Spectrometry - A New Element/Isotope Specific Mass Spectrometry Detector for Chromatography. *Spectrosc. Lett.* 1986, 19 (10), 1125–1135.
- (177) Chong, N. S.; Houk, R. S. Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry For Elemental Analysis and Isotope Ratio Determinations in Individual Organic Compounds Separated by Gas Chromatography. *Appl. Spectrosc.* 1987, 41 (1), 66–74.
- (178) Bouyssiere, B.; Szpunar, J.; Lobinski, R. Gas Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection in Speciation Analysis. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 2002, 57 (5), 805–828.
- (179) Pretorius, W. G.; Ebdon, L.; Rowland, S. J. Development of a High-Temperature Gas Coupled Plasma Mass Spectrometry Interface for the Determination of Metalloporphyrins. *J. Chromatogr.* 1993, 646, 369–375.
- (180) Leach, A. M.; Heisterkamp, M.; Adams, F. C.; Hieftje, G. M. Gas Chromatography-Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometry for the Speciation Analysis of Organometallic Compounds. *J. Anal. At. Spectrom.* 2000, 15, 151–155.
- (181) Rodríguez, I.; Mounicou, S.; Lobinski, R.; Sidelnikov, V.; Patrushev, Y.; Yamanaka, M. Species-Selective Analysis by Microcolumn Multicapillary Gas Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric Detection. *Anal. Chem.* 1999, 71 (20), 4534–4543.
- (182) Kim, A. W.; Foulkes, M. E.; Ebdon, L.; Hill, S. J.; Patience, R. L.; Barwise, A. G.; Rowland, S. J. Construction of a Capillary Gas Chromatography Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Transfer Line and Application of the Technique to the Analysis of Alkyllead Species in Fuel. *J. Anal. At. Spectrom.* 1992, 7, 1147–1149.
- (183) Smaele, T. De; Verrept, P.; Moens, L.; Dams, R. A Flexible Interface for the Coupling of Capillary Gas Chromatography with Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Spectrochim. Acta - Part B* 1995, 50, 1409–1416.
- (184) Montes Bayón, M.; Gutiérrez Cambor, M.; Garcia Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. An Alternative GC-ICP-MS Interface Design for Trace Element Speciation †. *J. Anal. At. Spectrom.* 1999, 14, 1317–1322.
- (185) Tseng, C. M.; Diego, A. De; Pinaly, H.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. Cryofocusing Coupled to Atomic Absorption Spectrometry for Rapid and Simple Mercury Speciation in Environmental Matrices. *J. Anal. At. Spectrom.* 1998, 13, 755–764.

- (186) Pecheyran, C.; Quétel, C. R.; Lecuyer, F. M. M.; Donard, O. F. X. Simultaneous Determination of Volatile Metal (Pb, Hg, Sn, In, Ga) and Nonmetal Species (Se, P, As) in Different Atmospheres by Cryofocusing and Detection by ICPMS. *Anal. Chem.* 1998, 70, 2639–2645.
- (187) García Segovia, E.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. Determination of Butyltin Compounds in Sediments by Means of Hydride Generation/Cold Trapping Gas Chromatography Coupled to Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometric. *J. Mass Spectrom.* 1997, 32, 542–549.
- (188) Peters, G. R.; Beauchemin, D. Versatile Interface for Gas Chromatographic Detection or Solution Nebulization Analysis by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: Preliminary Results. *J. Anal. At. Spectrom.* 1992, 7, 965–969.
- (189) Feldmann, J.; Grümping, R.; Hirner, A. V. Determination of Volatile Metal and Metalloid Compounds in Gases from Domestic Waste Deposits with GC/ICP-MS. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1994, 350, 228–234.
- (190) Epov, V. N.; Rodríguez-González, P.; Sonke, J. E.; Tessier, E.; Amouroux, D.; Bourgoin, L. M.; Donard, O. F. X. Simultaneous Determination of Species-Specific Isotopic Composition of Hg by Gas Chromatography Coupled to Multicollector ICPMS. *Anal. Chem.* 2008, 80 (10), 3530–3538.
- (191) Petersen, C. G. J. The Yearly Immigration of Young Plaice into the Limfjord from the German Sea. In *The Danish Biological Station*; 1895; p 60.
- (192) Jackson, C. H. N. On the True Density of Tsetse Flies. *J. Anim. Ecol.* 1933, 2 (2), 204–209.
- (193) Roth, E. Critical Evaluation of the Use and Analysis of Stable Isotopes. *Pure Appl. Chem.* 1997, 69 (8), 1753–1828.
- (194) Hevesy, G.; Hobbie, R. Lead Content in Rocks. *Nature* 1931, 128 (3242), 1038–1039.
- (195) Rittenberg, D.; Foster, G. L. A New Procedure for Quantitative Analysis by Isotope Dilution, with Application to the Determination of Amino Acids and Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* 1940, 133, 737–744.
- (196) Ussing, H. H. Analysis of Protein by Means of Deuterium-Containing Amino-Acids. *Nature* 1939, 144 (3658), 977.
- (197) Urey, H. C.; Teal, G. K. The Hydrogen Isotope of Atomic Weight Two. *Rev. Mod. Phys.* 1935, 7, 34–90.
- (198) Urey, H. C.; Brickwedde, F. G.; Murphy, G. M. A Hydrogen Isotope of Mass Two and Its Concentration. *Phys. Rev.* 1932, 40 (1), 1–15.
- (199) Grosse, A. V.; Hindin, S. G.; Kirshenbaum, A. D. Elementary Isotopic Analysis. *Anal. Chem.* 1949, 21 (3), 386–390.
- (200) Graff, S.; Rittenberg, D.; Foster, G. L. The Glutamic Acid of Malignant Tumors. *J. Biol. Chem.* 1940, 133, 745–752.
- (201) Inghram, M. G. Stable Isotope Dilution as an Analytical Tool. *Annu. Rev. Nucl. Sci.* 1954, 4, 81–92.
- (202) Quinn, T. J. Primary Methods of Measurement and Primary Standards. *Metrologia* 1997, 34, 61–65.
- (203) Meija, J.; Mester, Z. Paradigms in Isotope Dilution Mass Spectrometry for Elemental Speciation Analysis. *Anal. Chim. Acta* 2008, 608, 115–125.
- (204) Hintenberger, H. A Survey of the Use of Stable Isotopes in Dilution Analyses. In *Electromagnetically Enriched Isotopes and Mass Spectrometry*; Smith, M. L., Ed.; Butterworths: London, 1956; p 177.
- (205) Rodríguez-González, P.; Marchante-Gayón, J. M.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. Isotope Dilution Analysis for Elemental Speciation: A Tutorial Review. *Spectrochim. Acta - Part B* 2005, 60, 151–207.
- (206) Berglund, M.; Wieser, M. E. Isotopic Compositions of the Elements 2009 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2011, 83 (2), 397–410.
- (207) Castillo, A.; Rodríguez-González, P.; Centineo, G.; Roig-Navarro, A. F.; García Alonso, J. I. Multiple Spiking Species-Specific Isotope Dilution Analysis by Molecular Mass Spectrometry: Simultaneous Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Fish Tissues. *Anal. Chem.* 2010, 82 (7), 2773–2783.
-

-
- (208) Meija, J.; Yang, L.; Caruso, J. A.; Mester, Z. Calculations of Double Spike Isotope Dilution Results Revisited. *J. Anal. At. Spectrom.* 2006, 21, 1294–1297.
- (209) Rodríguez-Castrillón, J. Á.; Moldovan, M.; García Alonso, J. I.; Lucena, J. J.; García-Tomé, M. L.; Hernández-Apaolaza, L. Isotope Pattern Deconvolution as a Tool to Study Iron Metabolism in Plants. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390, 579–590.
- (210) González Iglesias, H.; Fernández Sánchez, M. L.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. Use of Enriched ^{74}Se and ^{77}Se in Combination with Isotope Pattern Deconvolution to Differentiate and Determine Endogenous and Supplemented Selenium in Lactating Rats. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 389, 707–713.
- (211) Rodríguez-Castrillón, J. Á.; Moldovan, M.; Ruiz Encinar, J.; García Alonso, J. I. Isotope Pattern Deconvolution for Internal Mass Bias Correction in the Characterisation of Isotopically Enriched Spikes. *J. Anal. At. Spectrom.* 2008, 23 (3), 318.
- (212) Hintelmann, H.; Evans, R. D. Application of Stable Isotopes in Environmental Tracer Studies - Measurement of Monomethylmercury (CH_3Hg^+) by Isotope Dilution ICP-MS and Detection of Species Transformation. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1997, 358, 378–385.
- (213) Kingston, H. M. "Skip"; Huo, D.; Lu, Y.; Chalk, S. Accuracy in Species Analysis: Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry (SIDMS) Exemplified by the Evaluation of Chromium Species. *Spectrochim. Acta Part B* 1998, 53, 299–309.
- (214) Rodríguez-González, P.; Ruiz Encinar, J.; García; Sanz-Medel, A. Monitoring the Degradation and Solubilisation of Butyltin Compounds during *in Vitro* Gastrointestinal Digestion Using "Triple Spike" Isotope Dilution GC-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 381, 380–387.
- (215) García Alonso, J. I.; Ruiz-Encinar, J.; Rodríguez-González, P.; Sanz-Medel, A. Determination of Butyltin Compounds in Environmental Samples by Isotope-Dilution GC-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 373, 432–440.
- (216) Rodríguez-González, P.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. Development of a Triple Spike Methodology for Validation of Butyltin Compounds Speciation Analysis by Isotope Dilution Mass Spectrometry Part 2. Study of Different Extraction Procedures for the Determination of Butyltin Compounds in Mussel Tissue CRM 477. *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, 19, 767–772.
- (217) Huo, D.; Kingston, H. Correction of Species Transformations in the Analysis of Cr(VI) in Solid Environmental Samples Using Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2000, 72 (20), 5047–5054.
- (218) Rodríguez-González, P.; Ruiz-Encinar, J.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. Development of a Triple Spike Methodology for Validation of Butyltin Compounds Speciation Analysis by Isotope Dilution Mass Spectrometry Part I. Synthesis of the Spike, Characterisation and Development of the Mathematical Equations. *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, 19, 685–691.
- (219) Rodríguez-González, P.; Rodríguez-Cea, A.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. Species-Specific Isotope Dilution Analysis and Isotope Pattern Deconvolution for Butyltin. *Anal. Chem.* 2005, 77 (23), 7724–7734.
- (220) Monperrus, M.; Rodríguez-González, P.; Amouroux, D.; Garcia Alonso, J. I.; Donard, O. F. X. Evaluating the Potential and Limitations of Double-Spiking Species-Specific Isotope Dilution Analysis for the Accurate Quantification of Mercury Species in Different Environmental Matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 390 (2), 655–666.
- (221) Pickup, J. F.; McPherson, K. Theoretical Considerations in Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry for Organic Analysis. *Anal. Chem.* 1976, 48, 1885–1890.
- (222) Berg, T.; Strand, D. H. ^{13}C Labelled Internal Standards—A Solution to Minimize Ion Suppression Effects in Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry Analyses of Drugs in Biological Samples? *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 9366–9374.
- (223) Itoh, N.; Numata, M.; Aoyagi, Y.; Yarita, T. Comparison of the Behavior of ^{13}C - and Deuterium-Labeled Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Analyses by Isotope Dilution Mass Spectrometry in Combination with Pressurized Liquid Extraction. *J. Chromatogr. A* 2007, 1138, 26–31.
- (224) Wade, D. Deuterium Isotope Effects on Noncovalent Interactions between Molecules. *Chem. Biol. Interact.* 1999, 117, 191–217.
- (225) Wieling, J. LC-MS-MS Experiences with Internal Standards. *Chromatogr. Suppl.* 2002, 55, S.107-
-

- S.113.
- (226) Stokvis, E.; Rosing, H.; Beijnen, J. H. Stable Isotopically Labeled Internal Standards in Quantitative Bioanalysis Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry: Necessity or Not? *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005, 19, 401–407.
- (227) Dong, Y.; Tang, M.; Song, H.; Li, R.; Wang, C.; Ye, H.; Qiu, N.; Zhang, Y.; Chen, L.; Wei, Y. Characterization of Metabolic Profile of Honokiol in Rat Feces Using Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry and ¹³C Stable Isotope Labeling. *J. Chromatogr. B* 2014, 953–954, 20–29.
- (228) Fabregat-Cabello, N.; Sancho, J. V.; Vidal, A.; González, F. V.; Roig-Navarro, A. F. Development and Validation of a Liquid Chromatography Isotope Dilution Mass Spectrometry Method for the Reliable Quantification of Alkylphenols in Environmental Water Samples by Isotope Pattern Deconvolution. *J. Chromatogr. A* 2014, 1328, 43–51.
- (229) Liu, S.; Cui, M.; Liu, Z.; Song, F.; Mo, W. Structural Analysis of Saponins from Medicinal Herbs Using Electrospray. *Am. Soc. Microbiol.* 2004, 15, 133–141.
- (230) Fernández-Fernández, M.; González-Antuña, A.; Rodríguez-González, P.; Añón Álvarez, M. E.; Álvarez Menéndez, F. V.; García Alonso, J. I. Development of an Isotope Dilution GC–MS Procedure for the Routine Determination of Creatinine in Complex Serum Samples. *Clin. Chim. Acta* 2014, 431, 96.
- (231) Jonckheere, J. A.; Leenheer, A. P. De; Steyaert, H. L. Statistical Evaluation of Calibration Curve Nonlinearity in Isotope Dilution Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Am. Chem. Soc.* 1982, 55 (1), 153–155.
- (232) Sabot, J.; Pinatel, H. Calculation of the Confidence Range in Order to Obtain a Linear Calibration Graph in Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry: Application to Reference Methods and Pharmacological Studies. *Analyst* 1993, 118, 831–834.
- (233) Budzikiewicz, H.; Grigsby, R. D. MASS SPECTROMETRY AND ISOTOPES: A CENTURY OF RESEARCH AND DISCUSSION. *Mass Spectrom. Rev.* 2006, 25, 146–157.
- (234) Allègre, C. J. *Isotope Geology*; Cambridge University Press: New York, 2012.
- (235) Muccio, Z.; Jackson, G. P. *Isotope Ratio Mass Spectrometry*. *Analyst* 2009, 134 (2), 213–222.
- (236) Platzner, I. T. *Modern Isotope Ratio Mass Spectrometry*; John Wiley & Sons Inc.: New York, 1997.
- (237) Hoefs, J. *Stable Isotope Geochemistry*. In *Stable Isotope Geochemistry*; Springer-Verlag: Berlin, 2009; p 286.
- (238) Vanhaecke, F.; Degryse, P. *Isotopic Analysis. Fundamentals and Applications Using ICP-MS*; Wiley-VCH Verlag: Weinheim, 2012.
- (239) Johnson, C. M.; Beard, B. L.; Albarède, F. *Geochemistry of Non-Traditional Stable Isotopes: 55. Reviews in Mineralogy & Geochemistry*; Mineralogical Society of America: Washington, DC, 2004.
- (240) Rayleigh, W. S. Theoretical Considerations Respecting the Separation of Gases by Diffusion and Similar Processes. *Philos. Mag.* 1896, 42, 493–498.
- (241) Urey, H. C. The Thermodynamic Properties of Isotopic Substances. *J. Chem. Soc.* 1946, 562–581.
- (242) Bigeleisen, J.; Mayer, M. G. Calculation of Equilibrium Constants for Isotopic Exchange Reactions. *J. Chem. Phys.* 1947, 15 (5), 261–267.
- (243) Young, E.; Galy, A.; Nagahara, H. Kinetic and Equilibrium Mass-Dependent Isotope Fractionation Laws in Nature and Their Geochemical and Cosmochemical Significance. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2002, 66 (6), 1095–1104.
- (244) Scott, K. M.; Lu, X.; Cavanaugh, C. M.; Liu, J. S. Optimal Methods for Estimating Kinetic Isotope Effects from Different Forms of the Rayleigh Distillation Equation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2003, 68 (3), 433–442.
- (245) Clayton, R. N.; Grossman, L.; Mayeda, T. K. A Component of Primitive Nuclear Composition in Carbonaceous Meteorites. *Science* (80-.). 1973, 182, 485–488.
- (246) Thiemens, M. H.; Heidenreich, J. E. The Mass-Independent Fractionation of Oxygen - a Novel Isotope Effect and Its Possible Cosmochemical Implications. *Science* (80-.). 1983, 219, 1073–1075.
-

- (247) Schauble, E. A. Role of Nuclear Volume in Driving Equilibrium Stable Isotope Fractionation of Mercury, Thallium, and Other Very Heavy Elements. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2007, 71 (9), 2170–2189.
- (248) Buchachenko, A. L. Magnetic Isotope Effect: Nuclear Spin Control of Chemical Reactions. *J. Phys. Chem. A* 2001, 105 (44), 9995–10011.
- (249) Fujii, T.; Moynier, F.; Albarède, F. The Nuclear Field Shift Effect in Chemical Exchange Reactions. *Chem. Geol.* 2009, 267, 139–156.
- (250) Bigeleisen, J. Nuclear Size and Shape Effects in Chemical Reactions. *Isotope Chemistry of the Heavy Elements. J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118 (15), 3676–3680.
- (251) Sonke, J. E. A Global Model of Mass Independent Mercury Stable Isotope Fractionation. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2011, 75 (16), 4577–4590.
- (252) Buchachenko, A. L.; Kouznetsov, D. A.; Shishkov, A. V. Spin Biochemistry: Magnetic Isotope Effect in the Reaction of Creatine Kinase with CH₃HgCl. *J. Phys. Chem. A* 2004, 108 (5), 707–710.
- (253) Navon, O.; Wasserburg, G. J. Self-Shielding in O₂- Possible Explanation for Oxygen Isotopic Anomalies in Meteorites ? *Earth Planet. Sci. Lett.* 1985, 73, 1–16.
- (254) Bally, J.; Langer, W. D. Isotope-Selective Photodestruction of Carbon Monoxide. *Astrophys. J.* 1982, 255, 143–148.
- (255) Lyons, J. R.; Young, E. D. CO Self-Shielding as the Origin of Oxygen Isotope Anomalies in the Early Solar Nebula. *Nature* 2005, 435, 317–320.
- (256) Gratz, L. E.; Keeler, G. J.; Blum, J. D.; Sherman, L. S. Isotopic Composition and Fractionation of Mercury in Great Lakes Precipitation and Ambient Air. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 (20), 7764–7770.
- (257) Sherman, L. S.; Blum, J. D.; Keeler, G. J.; Demers, J. D.; Dvonch, J. T. Investigation of Local Mercury Deposition from a Coal-Fired Power Plant Using Mercury Isotopes. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46 (1), 382–390.
- (258) Mead, C.; Lyons, J. R.; Johnson, T. M.; Anbar, A. D. Unique Hg Stable Isotope Signatures of Compact Fluorescent Lamp-Sourced Hg. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47 (6), 2542–2547.
- (259) Blum, J. D.; Bergquist, B. A. Reporting of Variations in the Natural Isotopic Composition of Mercury. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 388 (2), 353–359.
- (260) Blum, J. D.; Sherman, L. S.; Johnson, M. W. Mercury Isotopes in Earth and Environmental Sciences. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 2014, 42 (1), 249–269.
- (261) Lauretta, D. S.; Klaue, B.; Blum, J. D.; Buseck, P. R. Mercury Abundances and Isotopic Compositions in the Murchison (CM) and Allende (CV) Carbonaceous Chondrites. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2001, 65 (16), 2807–2818.
- (262) Jackson, T. A. Variations in the Isotope Composition of Mercury in a Freshwater Sediment Sequence and Food Web. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 2001, 58, 185–196.
- (263) Foucher, D.; Hintelmann, H. High-Precision Measurement of Mercury Isotope Ratios in Sediments Using Cold-Vapor Generation Multi-Collector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 384, 1470–1478.
- (264) Smith, C. N.; Kesler, S. E.; Blum, J. D. Mercury Isotope Fractionation in Fossil Hydrothermal Systems. *Geol. Soc. Am.* 2005, 33 (10), 825–828.
- (265) Bergquist, B. A.; Blum, J. D. Mass-Dependent and -Independent Fractionation of Hg Isotopes by Photoreduction in Aquatic Systems. *Science* (80-.). 2007, 318, 417–420.
- (266) Hulston, J. R.; Thode, H. G. Variations in the S₃₃, S₃₄ and S₃₆ Contents of Meteorites and Their Relation to Chemical and Nuclear Effects. *J. Geophys. Res.* 1965, 70 (14), 3475–3484.
- (267) Sonke, J. E.; Zambardi, T.; Toutain, J.-P. Indirect Gold Trap – MC-ICP-MS Coupling for Hg Stable Isotope Analysis Using a Syringe Injection Interface. *J. Anal. At. Spectrom.* 2008, 23, 569–573.
- (268) Laffont, L.; Sonke, J. E.; Maurice, L.; Hintelman, H.; Pouilly, M.; Sanchez Bacarreza, Y.; Perez, T.; Behra, P. Compositions of Fish and Human Hair in the Bolivian Amazon. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43, 8985–8990.

- (269) Perrot, V.; Epov, V. N.; Pastukhov, M. V.; Grebenshchikova, V. I.; Zouiten, C.; Sonke, J. E.; Husted, S.; Donard, O. F. X.; Amouroux, D. Tracing Sources and Bioaccumulation of Mercury in Fish of Lake Baikal–Angara River Using Hg Isotopic Composition. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 (21), 8030–8037.
- (270) Point, D.; Sonke, J. E.; Day, R. D.; Roseneau, D. G.; Hobson, K. a.; Vander Pol, S. S.; Moors, a. J.; Pugh, R. S.; Donard, O. F. X.; Becker, P. R. Methylmercury Photodegradation Influenced by Sea-Ice Cover in Arctic Marine Ecosystems. *Nat. Geosci.* 2011, 4 (3), 188–194.
- (271) Senn, D. B.; Chesney, E. J.; Blum, J. D.; Bank, M. S.; Maage, A.; Shine, J. P. Stable Isotope (N, C, Hg) Study of Methylmercury Sources and Trophic Transfer in the Northern Gulf of Mexico. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 (5), 1630–1637.
- (272) Kwon, S. Y.; Blum, J. D.; Chirby, M. A.; Chesney, E. J. Application of Mercury Isotopes for Tracing Trophic Transfer and Internal Distribution of Mercury in Marine Fish Feeding Experiments. *Environ. Toxicol. Chem.* 2013, 32 (10), 2322–2330.
- (273) Kwon, S. Y.; Blum, J. D.; Carvan, M. J.; Basu, N.; Head, J. A.; Madenjian, C. P.; David, S. R. Absence of Fractionation of Mercury Isotopes during Trophic Transfer of Methylmercury to Freshwater Fish in Captivity. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46 (14), 7527–7534.
- (274) Gehrke, G. E.; Blum, J. D.; Slotton, D. G.; Greenfield, B. K. Mercury Isotopes Link Mercury in San Francisco Bay Forage Fish to Surface Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45, 1264–1270.
- (275) Tsui, M. T. K.; Blum, J. D.; Finlay, J. C.; Balogh, S. J.; Kwon, S. Y.; Nollet, Y. H. Photodegradation of Methylmercury in Stream Ecosystems. *Limnol. Oceanography* 2013, 58 (1), 13–22.
- (276) Sherman, L. S.; Blum, J. D. Mercury Stable Isotopes in Sediments and Largemouth Bass from Florida Lakes, USA. *Sci. Total Environ.* 2013, 448, 163–175.
- (277) Zheng, W.; Hintelmann, H. Mercury Isotope Fractionation during Photoreduction in Natural Water Is Controlled by Its Hg/DOC Ratio. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2009, 73 (22), 6704–6715.
- (278) Zheng, W.; Hintelmann, H. Isotope Fractionation of Mercury during Its Photochemical Reduction by Low-Molecular-Weight Organic Compounds. *J. Phys. Chem.* 2010, 114, 4246–4253.
- (279) Blum, J. D.; Johnson, M. W.; Gleason, J. D.; Demers, J. D.; Landis, M. S.; Krupa, S. Mercury Concentration and Isotopic Composition of Epiphytic Tree Lichens in the Athabasca Oil Sands Region. In *Alberta Oil Sands: Energy, Industry, and the Environment*; Percy, K. E., Ed.; Elsevier Ltd.: Amsterdam, 2012; Vol. 11, pp 373–390.
- (280) Sherman, L. S.; Blum, J. D.; Johnson, K. P.; Keeler, G. J.; Barres, J. a.; Douglas, T. a. Mass-Independent Fractionation of Mercury Isotopes in Arctic Snow Driven by Sunlight. *Nat. Geosci.* 2010, 3 (3), 173–177.
- (281) Carignan, J.; Estrade, N.; Sonke, J. E.; Donard, O. F. X. Odd Isotope Deficits in Atmospheric Hg Measured in Lichens. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43 (15), 5660–5664.
- (282) Estrade, N.; Carignan, J.; Donard, O. F. X. Isotope Tracing of Atmospheric Mercury Sources in an Urban Area of Northeastern France. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 (16), 6062–6067.
- (283) Demers, J. D.; Blum, J. D.; Zak, D. R. Mercury Isotopes in a Forested Ecosystem: Implications for Air-Surface Exchange Dynamics and the Global Mercury Cycle. *Global Biogeochem. Cycles* 2013, 27, 222–238.
- (284) Smith, C. N.; Kesler, S. E.; Blum, J. D.; Rytuba, J. J. Isotope Geochemistry of Mercury in Source Rocks, Mineral Deposits and Spring Deposits of the California Coast Ranges, USA. *Earth Planet. Sci. Lett.* 2008, 269, 399–407.
- (285) Sherman, L. S.; Blum, J. D.; Nordstrom, D. K.; McCleskey, R. B.; Barkay, T.; Vetricani, C. Mercury Isotopic Composition of Hydrothermal Systems in the Yellowstone Plateau Volcanic Field and Guaymas Basin Sea-Floor Rift. *Earth Planet. Sci. Lett.* 2009, 279, 86–96.
- (286) Jiskra, M.; Wiederhold, J. G.; Bourdon, B.; Kretzschmar, R. Solution Speciation Controls Mercury Isotope Fractionation of Hg(II) Sorption to Goethite. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46 (12), 6654–6662.
- (287) Wiederhold, J. G.; Cramer, C. J.; Daniel, K.; Infante, I.; Bourdon, B.; Kretzschmar, R. Equilibrium Mercury Isotope Fractionation between Dissolved Hg(II) Species and Thiol-Bound Hg. *Environ. Sci. Technol.* 2010, 44 (11), 4191–4197.
-

- (288) Yin, R.; Feng, X.; Bo, M. Stable Hg Isotope Variation in Rice Plants (*Oryza Sativa* L.) from the Wanshan Hg Mining District, SW China. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47, 2238–2245.
- (289) Laffont, L.; Sonke, J. E.; Maurice, L.; Monrroy, S. L.; Chincheros, J.; Amouroux, D.; Behra, P. Hg Speciation and Stable Isotope Signatures in Human Hair as a Tracer for Dietary and Occupational Exposure to Mercury. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45 (23), 9910–9916.
- (290) Kritee, K.; Blum, J. D.; Johnson, M. W.; Bergquist, B. A.; Barkay, T. Mercury Stable Isotope Fractionation during Reduction of Hg(II) to Hg(0) by Mercury Resistant Microorganisms. *Environ. Sci. Technol.* 2007, 41 (6), 1889–1895.
- (291) Kritee, K.; Barkay, T.; Blum, J. D. Mass Dependent Stable Isotope Fractionation of Mercury during Mer Mediated Microbial Degradation of Monomethylmercury. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2009, 73 (5), 1285–1296.
- (292) Rodríguez-González, P.; Epov, V. N.; Bridou, R.; Tessier, E.; Guyoneaud, R.; Monperrus, M.; Amouroux, D. Species-Specific Stable Isotope Fractionation of Mercury during Hg(II) Methylation by an Anaerobic Bacteria (*Desulfobulbus Propionicus*) under Dark Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 2009, 43 (24), 9183–9188.
- (293) Estrade, N.; Carignan, J.; Sonke, J. E.; Donard, O. F. X. Mercury Isotope Fractionation during Liquid–vapor Evaporation Experiments. *Geochim. Cosmochim. Acta* 2009, 73 (10), 2693–2711.
- (294) Ghosh, S.; Schauble, E. A.; Lacrampe Couloume, G.; Blum, J. D.; Bergquist, B. A. Estimation of Nuclear Volume Dependent Fractionation of Mercury Isotopes in Equilibrium Liquid – Vapor Evaporation Experiments. *Chem. Geol.* 2013, 336, 5–12.
- (295) Day, R. D.; Roseneau, D. G.; Berail, S.; Hobson, K. A.; Donard, O. F. X.; Vander Pol, S. S.; Pugh, R. S.; Moors, A. J.; Long, S. E.; Becker, P. R. Mercury Stable Isotopes in Seabird Eggs Reveal a Gradient from Terrestrial Geogenic to Oceanic Mercury Reservoirs. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46, 5327–5335.
- (296) Günther, D.; Hattendorf, B. Solid Sample Analysis Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Trends Anal. Chem.* 2005, 24 (3), 255–265.
- (297) Davis, W. C.; Long, S. E. Measurements of Methylmercury, Ethylmercury, and Inorganic Mercury Species in a Whole Blood Standard Reference Material: SRM 955c—Toxic Elements in Caprine Blood. *J. Anal. At. Spectrom.* 2011, 26 (2), 431.
- (298) Ceulemans, M.; Witte, C.; Adams, F. C. Simplified Sample Preparation for GC Speciation Analysis of Organotin in Marine Biomaterials. 1994, 8, 451–461.
- (299) Rodríguez-González, P.; Monperrus, M.; García Alonso, J. I.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. 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.* 2007, 22, 1373.
- (300) Claverie, F.; Hubert, A.; Berail, S.; Donard, A.; Pointurier, F.; Pécheyran, C. Improving Precision and Accuracy of Isotope Ratios from Short Transient Laser Ablation-Multicollector-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Signals: Application to Micrometer-Size Uranium Particles. *Anal. Chem.* 2016, 88 (8), 4375–4382.
- (301) Dzurko, M.; Foucher, D.; Hintelmann, H. Determination of Compound-Specific Hg Isotope Ratios from Transient Signals Using Gas Chromatography Coupled to Multicollector Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (MC-ICP/MS). *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 393 (1), 345–355.
- (302) Fietzke, J.; Liebetrau, V.; Günther, D.; Gürs, K.; Hametner, K.; Zumholz, K.; Hansteen, T. H.; Eisenhauer, A. An Alternative Data Acquisition and Evaluation Strategy for Improved Isotope Ratio Precision Using LA-MC-ICP-MS Applied to Stable and Radiogenic Strontium Isotopes in Carbonates. *J. Anal. At. Spectrom.* 2008, 23 (7), 955.
- (303) Rodríguez-Castrillón, J. Á.; García-Ruiz, S.; Moldovan, M.; García Alonso, J. I. Multiple Linear Regression and On-Line Ion Exchange Chromatography for Alternative Rb-Sr and Nd-Sm MC-ICP-MS Isotopic Measurements. *J. Anal. At. Spectrom.* 2012, 27 (4), 611–618.
- (304) Brand, W. A.; Assonov, S. S.; Coplen, T. B. Correction for the ^{17}O Interference in $\delta(^{13}\text{C})$ Measurements When Analyzing CO_2 with Stable Isotope Mass Spectrometry (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2010, 82 (8), 1719–1733.
- (305) Masbou, J.; Point, D.; Guillou, G.; Sonke, J. E.; Lebreton, B.; Richard, P. Carbon Stable Isotope

- Analysis of Methylmercury Toxin in Biological Materials by Gas Chromatography Isotope Ratio Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2015, 87 (23), 11732–11738.
- (306) Stadlbauer, C.; Prohaska, T.; Reiter, C.; Knaus, A.; Stingeder, G. Time-Resolved Monitoring of Heavy-Metal Intoxication in Single Hair by Laser Ablation ICP-DRCMS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 383 (3), 500–508.
- (307) Airey, D. Mercury in Human Hair Due to Environment and Diet: A Review. *Environ. Health Perspect.* 1983, VOL. 52 (7), 303–316.
- (308) Davis, W. C.; Pol, S. Vander; Schantz, M. M.; Long, S. E.; Day, D.; Christopher, S. J. An Accurate and Sensitive Method for the Determination of Methylmercury in Biological Specimens Using GC-ICP-MS with Solid Phase Microextraction W. 2004, 1546–1551.
- (309) Demuth, N.; Heumann, K. G. Validation of Methylmercury Determinations in Aquatic Systems by Alkyl Derivatization Methods for GC Analysis Using ICP-IDMS. 2001, 73 (16), 4020–4027.
- (310) Qvarnström, J.; Lambertsson, L.; Havarinasab, S.; Hultman, P.; Frech, W. Determination of Methylmercury, Ethylmercury, and Inorganic Mercury in Mouse Tissues, Following Administration of Thimerosal, by Species-Specific Isotope Dilution GC-Inductively Coupled Plasma-MS. *Anal. Chem.* 2003, 75 (16), 4120–4124.
- (311) Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C.; Krupp, E.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. Application of Isotopically Labeled Methylmercury for Isotope Dilution Analysis of Biological Samples Using Gas Chromatography/ICPMS. *Anal. Chem.* 2002, 74 (11), 2505–2512.
- (312) Yang, L.; Mester, Z.; Sturgeon, R. E. Determination of Methylmercury in Fish Tissues by Isotope Dilution SPME-GC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 2003, 18 (5), 431–436.
- (313) Vogl, J. Characterisation of Reference Materials by Isotope Dilution Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 2007, 22, 475.
- (314) Ulberth, F. Certified Reference Materials for Inorganic and Organic Contaminants in Environmental Matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 386 (4), 1121–1136.
- (315) Davis, W. C.; Christopher, S. J.; Pugh, R. S.; Donard, O. F. X.; Krupp, E. A.; Point, D.; Horvat, M.; Gibičar, D.; Kljakovic-Gaspic, Z.; Porter, B. J.; et al. Certification of Methylmercury Content in Two Fresh-Frozen Reference Materials: SRM 1947 Lake Michigan Fish Tissue and SRM 1974b Organics in Mussel Tissue (*Mytilus Edulis*). *Anal. Bioanal. Chem.* 2007, 387 (7), 2335–2341.
- (316) Wise, S. A.; Benner, B. A.; Christensen, R. G.; Koster, B. J.; Kurz, J.; Schantz, M. M.; Zelsler, R. Preparation and Analysis of a Frozen Mussel Tissue Reference Material for the Determination of Trace Organic Constituents. *Environ. Sci. Technol.* 1991, 25 (10), 1695–1704.
- (317) Donais, M. K.; Saraswati, R.; Mackey, E.; Demiralp, R.; Porter, B.; Vangel, M.; Levenson, M.; Mandic, V.; Azemard, S.; Horvat, M.; et al. Certification of Three Mussel Tissue Standard Reference Materials (SRM) for Methylmercury and Total Mercury Content. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1997, 358 (3), 424–430.
- (318) Hoch, M. Organotin Compounds in the Environment - An Overview. *Appl. Geochemistry* 2001, 16, 719–743.
- (319) Baeuml, J.; Bose O'Reilly, S.; Matteucci Gothe, R.; Lettmeier, B.; Roider, G.; Drasch, G.; Siebert, U. Human Biomonitoring Data from Mercury Exposed Miners in Six Artisanal Small-Scale Gold Mining Areas in Asia and Africa. *Minerals* 2011, 1, 122–143.
- (320) Dolbec, J.; Mergler, D.; Soussa-Passos, C. J.; Soussa de Morais, S.; Lebel J. Methylmercury Exposure Affects Motor Performance of a Riverine Population of the Tapajós River, Brazilian Amazon. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 2000, 73 (3), 195–203.
- (321) World Health Organization. Human Biomonitoring: Facts and Figures, 2015, 89.
- (322) Clarkson, T. W. The Three Modern Faces of Mercury. *Environ. Health Perspect.* 2002, 110, 11–23.
- (323) Wilhelm, M.; Müller, F.; Idel, H. Biological Monitoring of Mercury Vapour Exposure by Scalp Hair Analysis in Comparison to Blood and Urine. *Toxicol. Lett.* 1996, 88 (1–3), 221–226.
- (324) Tsuji, J. S.; Williams, P. R. D.; Edwards, M. R.; Allamneni, K. P.; Kelsh, M. a.; Paustenbach, D. J.; Sheehan, P. J. Evaluation of Mercury in Urine as an Indicator of Exposure to Low Levels of Mercury Vapor. *Environ. Health Perspect.* 2003, 111 (4), 623–630.
-

- (325) Barregard, L.; Horvat, M.; Mazzolai, B.; Sällsten, G.; Gibicar, D.; Fajon, V.; diBona, S.; Munthe, J.; Wängberg, I.; Haeger Eugensson, M. Urinary Mercury in People Living near Point Sources of Mercury Emissions. *Sci. Total Environ.* 2006, 368, 326–334.
- (326) Berglund, M.; Lind, B.; Björnberg, K. A.; Palm, B.; Einarsson, Ö.; Vahter, M. Inter-Individual Variations of Human Mercury Exposure Biomarkers: A Cross-Sectional Assessment. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* 2005, 4, 1–11.
- (327) Vahter, M.; Akesson, A.; Lind, B.; Björs, U.; Schütz, A.; Berglund, M. Longitudinal Study of Methylmercury and Inorganic Mercury in Blood and Urine of Pregnant and Lactating Women, as Well as in Umbilical Cord Blood. *Environ. Res.* 2000, 84, 186–194.
- (328) Bose-O'Reilly, S.; Drasch, G.; Beinhoff, C.; Rodrigues-Filho, S.; Roider, G.; Lettmeier, B.; Maydl, A.; Maydl, S.; Siebert, U. Health Assessment of Artisanal Gold Miners in Indonesia. *Sci. Total Environ.* 2010, 408, 713–725.
- (329) Drasch, G.; Böse-O'Reilly, S.; Beinhoff, C.; Roider, G.; Maydl, S. The Mt. Diwata Study on the Philippines 1999 - Assessing Mercury Intoxication of the Population by Small Scale Gold Mining. 2001, 267 (1–3), 151–168.
- (330) Budtz-Jørgensen, E.; Grandjean, P.; Jørgensen, P. J.; Weihe, P.; Keiding, N. Association between Mercury Concentrations in Blood and Hair in Methylmercury-Exposed Subjects at Different Ages. *Environ. Res.* 2004, 95, 385–393.
- (331) Laffont, L.; Maurice, L.; Amouroux, D.; Navarro, P.; Monperrus, M.; Sonke, J. E.; Behra, P. Mercury Speciation Analysis in Human Hair by Species-Specific Isotope-Dilution Using GC-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 405 (9), 3001–3010.
- (332) Ishihara, N.; Urushiyama, K.; Suzuki, T. Inorganic and Organic Mercury in Blood, Urine and Hair in Low Level Mercury Vapour Exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1977, 40, 249–253.
- (333) Suzuki, T.; Shishido, S.; Ishihara, N. Interaction of Inorganic to Organic Mercury in Their Metabolism in Human Body. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 1976, 38, 103–113.
- (334) Cross, J. D.; Dale, I. M.; Goolvard, L.; Lenihan, J. M. A.; Smith, H. Methyl Mercury in Blood of Dentists. *Lancet* 1978, 312 (8084), 312–313.
- (335) Dock, L.; Rissanen, R.-L.; Vahter, M. Demethylation and Placental Transfer of Methyl Mercury in the Pregnant Hamster. *Toxicology* 1994, 94, 131–142.
- (336) Suda, I.; Hirayama, K. Degradation of Methyl and Ethyl Mercury into Inorganic Mercury by Hydroxyl Radical Produced from Rat Liver Microsomes. *Arch. Toxicol.* 1992, 66, 398–402.
- (337) Suzuki, T.; Hongo, T.; Yoshinaga, J.; Imai, H.; Nakazawa, M.; Matsuo, N.; Akagi, H. The Hair-Organ Relationship in Mercury Concentration in Contemporary Japanese. *Arch. Environ. Health* 1993, 48, 221–229.
- (338) Instituto Nacional de Seguridad, Salud y Bienestar en el Trabajo, I. Límites de Exposición Profesional Para Agentes Químicos En España 2018; 2018.
- (339) Gobierno del Principado de Asturias. Exposición a Mercurio En Asturias; 2013.
- (340) Korpiel, J. A.; Vidic, R. D. Effect of Sulfur Impregnation Method on Activated Carbon Uptake of Gas-Phase Mercury. *Environ. Sci. Technol.* 1997, 31, 2319–2325.
- (341) Legrand, M.; Lam, R.; Jensen-Fontaine, M.; Salin, E. D.; Chan, H. M. Direct Detection of Mercury in Single Human Hair Strands by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS). *J. Anal. At. Spectrom.* 2004, 19 (10), 1287–1288.
- (342) Queipo-Abad, S.; Rodríguez-González, P.; Davis, W. C.; García Alonso, J. I. Development of a Common Procedure for the Determination of Methylmercury, Ethylmercury, and Inorganic Mercury in Human Whole Blood, Hair, and Urine by Triple Spike Species-Specific Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2017, 89 (12), 6731–6739.
- (343) Bergquist, B. A.; Blum, J. D. The Odds and Evens of Mercury Isotopes: Applications of Mass-Dependent and Mass-Independent Isotope Fractionation. *Elements* 2009, 5 (6), 353–357.
- (344) Pedrero, Z.; Donard, O. F. X.; Amouroux, D. Pushing Back the Frontiers of Mercury Speciation Using a Combination of Biomolecular and Isotopic Signatures: Challenge and Perspectives. 2016.
- (345) Buchachenko, A. L. Magnetic Effects in Chemical Reactions. *Russ. Chem. Rev.* 1976, 45, 761–792.

- (346) Biswas, A.; Blum, J. D.; Bergquist, B. A.; Keeler, G. J.; Xie, Z. Natural Mercury Isotope Variation in Coal Deposits and Organic Soils. *Environ. Sci. Technol.* 2008, 42 (22), 8303–8309.
- (347) Rodríguez-González, P.; Epov, V. N.; Pecheyran, C.; Amouroux, D.; Donard, O. F. X. Species-Specific Stable Isotope Analysis by the Hyphenation of Chromatographic Techniques with MC-ICP-MS. *Mass Spectrom. Rev.* 2011, 31 (4), 504–521.
- (348) Perrot, V.; Masbou, J.; Pastukhov, M. V.; Epov, V. N.; Point, D.; Bérail, S.; Becker, P. R.; Sonke, J. E.; Amouroux, D. Natural Hg Isotopic Composition of Different Hg Compounds in Mammal Tissues as a Proxy for in Vivo Breakdown of Toxic Methylmercury †. *Metallomics* 2016, 8, 170–178.
- (349) Masbou, J.; Point, D.; Sonke, J. E.; Frappart, F.; Perrot, V.; Amouroux, D.; Richard, P.; Becker Paul R. Hg Stable Isotope Time Trend in Ringed Seals Registers Decreasing Sea Ice Cover in the Alaskan Arctic. *Environ. Sci. Technol.* 2015, 49 (15), 8977–8985.
- (350) Terán-Baamonde, J.; Bouchet, S.; Tessier, E.; Amouroux, D. Development of a Large Volume Injection Method Using a Programmed Temperature Vaporization Injector – Gas Chromatography Hyphenated to ICP-MS for the Simultaneous Determination of Mercury, Tin and Lead Species at Ultra-Trace Levels in Natural Waters. *J. Chromatogr. A* 2018, 1547, 77–85.
- (351) Masbou, J.; Point, D.; Sonke, J. E. Application of a Selective Extraction Method for Methylmercury Compound Specific Stable Isotope Analysis (MeHg-CSIA) in Biological Materials †. *J. Anal. At. Spectrom.* 2013, 28, 1620–1628.
- (352) Krupp, E. M.; Pécheyran, C.; Meffan-Main, S.; Donard, O. F. X. Precise Isotope-Ratio Determination by GCC Hyphenated to ICP-MCIMS for Speciation of Trace Amounts of Gaseous Sulfur, with SF₆ as Example Compound. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378 (2), 250–255.
- (353) Günther-Leopold, I.; Wernli, B.; Kopajtic, Z.; Günther, D. Measurement of Isotope Ratios on Transient Signals by MC-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378 (2), 241–249.
- (354) Gilmour, C. C.; Podar, M.; Bullock, A. L.; Graham, A. M.; Brown, S. D.; Somenahally, A. C.; Johs, A.; Hurt, R. A.; Bailey, K. L.; Elias, D. A. Mercury Methylation by Novel Microorganisms from New Environments. *Environ. Sci. Technol.* 2013, 47 (20), 11810–11820.
- (355) Wuerfel, O.; Greule, M.; Keppler, F.; Jochmann, M. A.; Schmidt, T. C. Position-Specific Isotope Analysis of the Methyl Group Carbon in Methylcobalamin for the Investigation of Biomethylation Processes. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405 (9), 2833–2841.
- (356) Sherwood-Lollar, B.; Hirschorn, S. K.; Chartrand, M. M. G.; Lacrampe-Couloume, G. An Approach for Assessing Total Instrumental Uncertainty in Compound-Specific Carbon Isotope Analysis: Implications for Environmental Remediation Studies. *Anal. Chem.* 2007, 79, 3469–3475.
- (357) Meyer, A. H.; Maier, M. P.; Elsner, M. Protocol to Investigate Volatile Aromatic Hydrocarbon Degradation with Purge and Trap Coupled to a Gas Chromatograph / Isotope Ratio Mass Spectrometer. In *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*; 2015; pp 259–288.
- (358) Zwank, L.; Berg, M.; Schmidt, T. C.; Haderlein, S. B. Compound-Specific Carbon Isotope Analysis of Volatile Organic Compounds in the Low-Microgram per Liter Range. *Anal. Chem.* 2003, 75, 5575–5583.
- (359) Wuerfel, O.; Thomas, F.; Schulte, M. S.; Hensel, R.; Diaz-Bone, R. A. Mechanism of Multi-Metal(Loid) Methylation and Hydride Generation by Methylcobalamin and Cob(I)Alamin: A Side Reaction of Methanogenesis. *Appl. Organomet. Chem.* 2012, 26 (2), 94–101.
- (360) Diaz-Bone, R. A.; Hitzke, M. Multi-Element Organometal(Loid) Speciation by Hydride Generation-GC-ICP-MS: Overcoming the Problem of Species-Specific Optima by Using a PH-Gradient during Derivatisation. *J. Anal. At. Spectrom.* 2008, 23 (6), 861–870.
- (361) Meija, J.; Ouerdane, L.; Mester, Z. Isotope Scrambling and Error Magnification in Multiple-Spiking Isotope Dilution. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 394, 199–205.
- (362) Clarkson, T. W.; Magos, L. Studies on the Binding of Mercury in Tissue Homogenates. *Biochem. J.* 1966, 99 (1), 62–70.
-