

DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES BASADA EN EL CÁLCULO POR DECONVOLUCIÓN DE PERFILES ISOTÓPICOS

Neus Fabregat Cabello

Tesis Doctoral

Dirigida por Antoni F. Roig i Navarro y Juan V. Sancho Llopis

Departamento de Química Física y Analítica

Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas

Junio 2015



UNIVERSITAT
JAUME·I



Universitat Jaume I

Departament de Química Física i Analítica

Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas

**DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA
DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES BASADA EN EL
CÁLCULO POR DECONVOLUCIÓN DE PERFILES ISOTÓPICOS**

Tesis Doctoral

NEUS FABREGAT CABELLO

2015

El Dr. **Antoni Francesc Roig i Navarro**, Profesor Titular, y el Dr. **Juan Vicente Sancho Llopis**, Catedrático de Química Analítica de la Universitat Jaume I de Castellón,

Certifican: que la Tesis Doctoral “Desarrollo de metodología analítica para la determinación de contaminantes basada en el cálculo por deconvolución de perfiles isotópicos” ha sido desarrollada bajo su dirección, en el Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas, Departamento de Química Física y Analítica de la Universitat Jaume I de Castellón, por **Neus Fabregat Cabello**.

Lo que certificamos para los efectos oportunos en Castellón de la Plana, a 30 de marzo de 2015.

Fdo. Dr. Antoni Francesc Roig i Navarro

Fdo. Dr. Juan Vicente Sancho Llopis

Este trabajo se ha realizado mediante la concesión una ayuda para investigadores en formación dentro del programa VALi+d por parte de la *Conselleria d'Educació, Cultura i Esport de la Generalitat Valenciana*, desde el 16 de abril de 2012.

Neus Fabregat Cabello ha sido beneficiaria de una beca concedida por la *Conselleria d'Educació, Cultura i Esport de la Generalitat Valenciana*, para la realización de una estancia en el instituto de seguridad alimentaria RIKILT, centro de investigación que forma parte de la Universidad de Wageningen (Países Bajos), desde el 1 de septiembre al 31 de diciembre de 2013. El trabajo realizado llevó por título "Comparación de distintas estrategias para combatir el efecto matriz en el análisis de micotoxinas" y se llevó a cabo bajo la supervisión del Dr. J. G. J. (Hans) Mol. La estancia en este centro de investigación permitió a la doctoranda profundizar en distintas metodologías capaces de compensar el efecto matriz y realizar una correcta cuantificación de las micotoxinas seleccionadas en matrices con alta dificultad analítica, incluyendo piensos y especias.

Los trabajos realizados en la presente memoria han sido en parte financiados por los proyectos de la Generalitat Valenciana (PROMETEO/2009/054; ISIC/2012/016), Fundación Bancaja-Universitat Jaume I (P1·1B2009-29) y Universitat Jaume I (P1·1B2013-55).

Esta tesis ha sido realizada, y consecuentemente será defendida, con el propósito de obtener el título de Doctorado Internacional.

Previamente a la defensa de la Tesis Doctoral, este trabajo ha sido evaluado por dos censores extranjeros independientes, Dr. Arjen Gerssen (RIKILT, Wageningen UR, Wageningen, Países Bajos) y el Dr. Alexander van Nuijs (Departamento de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de Amberes, Bélgica).

A mis padres

Resumen

El análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas (IDMS) es reconocido como una de las técnicas más potentes para obtener resultados altamente fiables y de gran calidad metrológica en el campo de la química analítica. IDMS destaca como la forma de cuantificación más adecuada ante determinaciones realizadas en matrices de alta complejidad, siendo por ello ampliamente utilizado durante el acoplamiento de las técnicas de cromatografía a la espectrometría de masas. Además IDMS también permite corregir variaciones de la señal en el detector así como las interconversiones o pérdidas de analito durante todo el tratamiento de muestra. IDMS permite, por tanto, corregir problemas que pueden aparecer a lo largo de todo el proceso analítico.

La presente tesis versa sobre el desarrollo de metodología analítica basada en IDMS haciendo uso de la herramienta matemática de Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD) para la cuantificación de los analitos. A pesar de que este tipo de cuantificación evita el uso de curvas de calibrado metodológico y permite el solapamiento espectral entre compuestos de composición natural y enriquecidos, su aplicación en métodos de rutina todavía se encuentra en pleno desarrollo. La técnica IPD permite la cuantificación mediante una sola inyección, reduciendo de forma considerable el tiempo total de análisis.

En todas las metodologías desarrolladas a lo largo de esta tesis se ha hecho uso del acoplamiento de la cromatografía líquida a la espectrometría de masas, ya sea simple o en tándem. Para ello se han seleccionado distintas combinaciones matriz-analito en determinaciones con conocida dificultad analítica, tanto de naturaleza inorgánica como orgánica.

El trabajo realizado se ha estructurado en tres bloques. En el primero, se ha desarrollado un método para la cuantificación de cromo hexavalente (Cr(VI)) en suelos y otras muestras sólidas de índole medioambiental, mediante

cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (LC-ICP-MS). El segundo bloque se centra en la determinación de alquilfenoles (nonilfenol y octilfenol) y del bisfenol A en distintas muestras de agua. Para asegurar la ausencia de efectos isotópicos, o distinto comportamiento entre compuestos naturales y sus análogos marcados isotópicamente, se han sintetizado sus correspondientes patrones internos con un solo carbono-13: el $^{13}\text{C}_1$ -nonilfenol y el $^{13}\text{C}_1$ -octilfenol. Para finalizar, en el último bloque se ha evaluado el efecto matriz en las cuantificaciones mediante LC-MS. Se ha utilizado como caso de estudio la determinación de micotoxinas en piensos y especias, matrices con conocido efecto matriz y se han ensayado diversas formas de calibrado que lo corrigen, entre ellas IPD.

Tal y como se ha comentado anteriormente, el primer bloque incluye el desarrollo de un método para la correcta determinación de Cr(VI) en muestras sólidas medioambientales, principalmente suelos. Para ello se utilizaron dos trazadores isotópicos, el $^{50}\text{Cr}(\text{VI})$ y el $^{53}\text{Cr}(\text{III})$, con el propósito de poder estudiar y corregir las interconversiones entre ambas especies. El grueso de la investigación fue la optimización de la etapa de extracción. Se alcanzaron resultados cuantitativos para el Cr(VI) en sólo 10 minutos mediante microondas focalizadas, utilizando como extractante una solución 50 mmol/L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) a pH 10. El tratamiento de muestra fue simplificado respecto a trabajos anteriores ya que una dilución 1:10 de la solución anterior fue empleada como fase móvil y el Cr(III) fue estabilizado. Además, la formación de $\text{Cr}(\text{III})\text{-EDTA}^-$ permitió separar el Cr(III) cromatográficamente del Cr(VI) (presente como CrO_4^{2-}) mediante cromatografía de intercambio aniónico. Para garantizar los resultados obtenidos el estudio fue realizado sobre los materiales de referencia certificados NIST 2700 y NIST 2701 (suelos contaminados por Cr(VI) a dos niveles de concentración). La metodología propuesta evita la oxidación del Cr(III) en los dos materiales de referencia estudiados, no siendo por tanto necesario el uso de dos trazadores y pudiéndose emplear sólo el de Cr(VI) en futuras aplicaciones del método optimizado.

Tras aplicar la metodología de IPD en su contexto habitual, el análisis elemental, a partir del segundo bloque se inicia su aplicación al campo de análisis de compuestos orgánicos.

Así, el segundo bloque se enmarca en el campo de los compuestos disruptores endocrinos a través de su cuantificación en aguas mediante IDMS e IPD. Para ello, en un primer momento se llevó a cabo la síntesis, caracterización y aplicación de trazadores enriquecidos isotópicamente con un solo ^{13}C , con el objetivo de asegurar la ausencia de efectos isotópicos. A tal efecto, el $^{13}\text{C}_1$ -nonilfenol fue sintetizado en un primer trabajo y el $^{13}\text{C}_1$ -octilfenol en el segundo trabajo, en el que fueron utilizados conjuntamente. En un tercer trabajo se utilizaron los dos compuestos anteriores junto al $^{13}\text{C}_{12}$ -bisfenol A, para cuantificar a sus análogos de composición isotópica natural. Estos tres trabajos tienen en común el uso de la cromatografía líquida de ultra alta resolución, acoplada a la espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS (QqQ)) para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos. Los analitos seleccionados, los alquilfenoles y el bisfenol A, fueron determinados en aguas embotelladas, residuales y superficiales. Cabe destacar las estrictas medidas necesarias para evitar la contaminación durante el tratamiento de muestra y análisis, sobre todo en el caso del nonilfenol.

En el primer trabajo de este bloque, el isómero sintetizado, el $^{13}\text{C}_1$ -4-(3,6-dimetil-3-heptil)fenol ($^{13}\text{C}_1$ -NP), se utilizó para cuantificar la mezcla técnica de nonilfenol en aguas, tras una extracción previa y preconcentración mediante cartuchos de extracción en fase sólida (SPE). La cuantificación basada en IPD y marcaje isotópico mínimo fue comparada con el uso de un patrón interno habitual en este tipo de análisis, la forma lineal de nonilfenol (n-nonilfenol). Las cuantificaciones realizadas con el patrón interno n-nonilfenol aportaron resultados significativamente superiores a los reales. Sin embargo, los valores para los ensayos de recuperación por IPD con $^{13}\text{C}_1$ -NP estuvieron entre el 83 y el 108% con coeficientes de variación entre el 1.5 y el 9%.

En el segundo trabajo de este bloque se utilizaron ambos trazadores isotópicos sintetizados, el $^{13}\text{C}_1\text{-NP}$ y el $^{13}\text{C}_1\text{-4-tert}$ octilfenol ($^{13}\text{C}_1\text{-OP}$). A diferencia del trabajo anterior, se apostó por una técnica de extracción más novedosa, la microextracción en fase líquida utilizando fibras huecas como soporte de la fase aceptora (HF-LPME). Tras la optimización, la extracción se realizó durante 30 minutos, utilizando octanol como fase aceptora de los analitos. En comparación con otras técnicas como la SPE, la HF-LPME reduce los costes por extracción a unos pocos céntimos por fibra y el volumen de disolventes orgánicos necesario a unos pocos microlitros. Durante su validación, se alcanzaron límites de cuantificación de $0,1 \mu\text{g/L}$ y recuperaciones entre el 97 y el 109% para ambos compuestos.

En el último trabajo incluido en este bloque se desarrollaron dos métodos de extracción para la determinación conjunta de bisfenol A (BPA), octilfenol y nonilfenol en aguas de consumo y medioambientales. En este caso, el análogo marcado utilizado fue el $^{13}\text{C}_{12}\text{-BPA}$, adquirido de forma comercial. Por una parte, se optimizó la extracción por SPE utilizando cartuchos de tipo C18. Por otra, se optimizó la extracción mediante el uso de HF-LPME. Ambas metodologías fueron comparadas en términos de precisión, coste, facilidad de uso, tiempo y uso de disolventes. Como en trabajos anteriores, los límites de cuantificación para los alquilfenoles alcanzados fueron $0,1 \mu\text{g/L}$ mientras que el caso del bisphenol tuvo que ser elevado a $0,5 \mu\text{g/L}$ por cuestiones de sensibilidad y precisión durante las medidas.

El tercer y último bloque aborda el problema del efecto matriz en el análisis de micotoxinas mediante fuente de ionización electrospray en determinaciones por LC-MS/MS. Para ello, se extiende la cuantificación por IPD hasta 9 micotoxinas, ya que sus análogos marcados isotópicamente con todos los ^{12}C sustituidos por ^{13}C se encontraban disponibles de forma comercial. El estudio fue llevado a cabo en matrices con alta complejidad, incluyendo especias y piensos. En una primera aproximación se estudió la corrección del efecto matriz mediante la monitorización continua de un compuesto introducido de

forma constante junto a la fase móvil, aunque sin obtener resultados satisfactorios. También se estudió el efecto matriz mediante la fortificación de los extractos tras la etapa de extracción. En una segunda parte del estudio se realizó de forma simultánea la cuantificación mediante 5 aproximaciones distintas: adiciones estándar con un punto y con calibrado, calibrado utilizando patrones internos marcados isotópicamente, así como dos formas de calcular con un solo punto las concentraciones: IPD y el calibrado interno isotópico (OPIC). En general, los valores de recuperaciones fueron adecuados en todas las aproximaciones excepto en los casos de IPD y OPIC para las fumonisinas y de adiciones estándar con un solo punto si la adición era demasiado próxima a la concentración de la muestra. Se observó que en el caso de que los patrones internos marcados isotópicamente no estuvieran disponibles, el uso de adiciones estándar a un solo nivel, suficientemente elevado dentro de un rango, ofrecía los mejores resultados.

Summary

ANALYTICAL METHOD DEVELOPMENT FOR THE DETERMINATION OF CONTAMINANTS BASED ON ISOTOPE PATTERN DECONVOLUTION CALCULATIONS

Nowadays, Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) stands out as one of the most powerful techniques in analytical chemistry for achieving results both reliable and with the highest metrological quality. When dealing with determinations in highly complex matrices, IDMS is the best approach to correct for uncontrolled signal modifications during detection. As a consequence, the use of isotope-labeled standards has been spread out when coupling liquid chromatography to mass spectrometry. Besides, this technique is also able to compensate for analytes losses and allows the correction for species interconversion reactions during all the analytical procedure.

The present Doctoral Thesis is focused on the development of new analytical methodologies based on IDMS and Isotope Pattern Deconvolution (IPD) calculations for the accurate quantification of a wide range of analytes. IPD quantification tool allows quantification without resorting to a methodological calibration graph. Besides, IPD is able to overcome mass spectrum overlapping between labeled and unlabeled compounds. In other words, IPD permits quantification by one injection-one result, reducing considerably the total analysis time. Despite all this facts, there is still scarce methodology based on IPD for its application in routine laboratories.

All methodologies included in this document combine liquid chromatography separations with mass spectrometry detection, with single or tandem quadrupole mass analyzers. To that end, a wide variety of challenging matrix-

analyte combinations have been studied, including organic and inorganic substances.

The procedures developed are distributed in three parts. Firstly, a method for the determination of hexavalent chromium (Cr (VI)) in soils and other environmental solids has been developed. The corresponding quantification of Cr (VI) was carried out by liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS). In the second part, methodology for quantifying endocrine disrupting compounds in water samples was developed, including alkylphenols (octylphenol and nonylphenol) and bisphenol A. Given the fact that isotope effects between the natural and the labeled compounds may exist, single-labeled internal standards for alkylphenols were synthesized ($^{13}\text{C}_1$ -nonylphenol and $^{13}\text{C}_1$ -octylphenol). In the last part, a thorough study of matrix effect in LC-MS based quantifications is included. As a case study, the determination of mycotoxins in food and feed has been selected due to their known matrix effect. Also, different calibration approaches have been tested, including IPD calculations.

As stated before, the first part of this document concerns the accurate and fast determination of Cr (VI) in solid samples. In order to correct for interconversions between chromium species during sample treatment, a double spike solution was employed with ^{50}Cr (VI) and ^{53}Cr (III). The major part of optimization in this work was related to obtain a quantitative extraction with low interconversion rates by microwave assisted extraction. Optimum conditions were achieved in 10 minutes by means of focused microwave assisted extraction using 50 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at pH 10 as extractant. These conditions simplifies previous procedures since a ten-fold dilution of the extractant solution is employed also as mobile phase and Cr(III) and EDTA also stabilizes Cr(III) forms. Furthermore chromatographic separation of Cr(VI) (as CrO_4^{2-}) from Cr(III) by anionic exchange was possible thanks to the occurrence of complex Cr(III)-EDTA. Lastly, the developed methodology was validated and has been shown

to quantitatively extract all forms of hexavalent chromium from the standard reference materials (SRM) candidate NIST 2700 and NIST 2701 (Hexavalent chromium in contaminated soil, low and high level). Thus, the use of a double spiking strategy for quantification is no longer required and a single spike IDMS procedure using isotopically enriched Cr(VI) can be employed in future applications.

After the application of IPD calculations in elemental speciation, maybe its most studied area, in the second and subsequent parts of this document the study is orientated to the field of organic analytical chemistry.

On the basis of endocrine disrupting compounds analysis, the second part of this Doctoral Thesis deals with IDMS and IPD quantifications in water samples. To that end, two singly ^{13}C -labelled alkylphenols were synthesized prepared in-house, characterized and used for quantification purposes. In the first method, $^{13}\text{C}_1$ -nonylphenol was used for quantification purposes while both this compound and $^{13}\text{C}_1$ -octylphenol were used in the second method developed. The second part of this Doctoral Thesis ends with a third method developed for the analysis of the sought alkylphenols and bisphenol A, by means of $^{13}\text{C}_{12}$ -bisphenol A. All three procedures relied on liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with triple quadrupole (QQQ) in bottled water, surface water and were studied in drinking water, surface water and wastewater. It is worth stressing that strict measures were taken to avoid and decrease contamination during sample treatment, especially in the case of nonylphenol.

In the first method of the second part of this Doctoral Thesis, the labeled nonylphenol isomer $^{13}\text{C}_1$ -4-(3, 6-dimethyl-3-heptyl) phenol ($^{13}\text{C}_1$ -NP) was used for the determination of 4-nonylphenol (technical mixture) in complex matrices such as water samples. Given the low levels of NP in water samples, a pre-treatment by means of solid phase extraction (SPE) was carried out. Quantification based on IPD and minimal labeling compounds was compared

with the most usual classical calibration procedure using 4-n-nonylphenol as internal standard. A considerable overestimation was obtained with the linear standard. On the contrary, recoveries within 83–108% and coefficients of variation ranging from 1.5% to 9% were obtained with $^{13}\text{C}_1$ -NP and IPD calculations.

The second procedure dealt with the simultaneous determination of octylphenol (OP) and nonylphenol (NP). For this purpose, a new isotopically labeled compound was synthesized, $^{13}\text{C}_1$ -OP, and used together with $^{13}\text{C}_1$ -NP. Contrary to the previous developed methodology, a non-conventional extraction procedure is proposed, hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME). The best extraction conditions were achieved with octanol as acceptor phase after a 30-min extraction. Compared with traditional extraction procedures such as SPE, HF-LPME reduces drastically the time and extraction costs as well as the total solvent consumption. Regarding validation, the lowest validated level for both compounds was 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ and recoveries within 97–109% were achieved.

To conclude this part, two different methodologies have been developed and validated for the determination of bisphenol A (BPA), t-octylphenol (OP) and the technical mixture of nonylphenol (NP) in water samples. In contrast to the other developed methodologies, the isotopically labeled analogue for BPA was acquired in its commercially available form, $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA. Two extraction methodologies were optimized for the three compounds: SPE using C18 glass cartridges and HF-LPME. Both extraction procedures were compared in terms of accuracy, cost, time, solvent consumption and difficulty of manipulation. In line with previous works, the limits of quantification achieved for alkylphenols were 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ and 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ for BPA due to its lower sensitivity.

Finally, in the third part of this document, the matrix effect (ME) issue in electrospray sources in LC-MS systems is addressed during the determination of mycotoxins. For this purpose, quantification by different methodologies is extended to 9 mycotoxins, since their uniformly [¹³C]-labelled (U-labelled) analogues were available. The present study was carried out in complex matrices, including feed and spices. In a first approach the quantitative correction of ME was studied by monitoring the signal of a compound (added to the mobile phase) during the entire chromatographic run, but without success. Alternatively, ME was measured by post-extraction addition. Also, five different calibration approaches to compensate for matrix effects were compared: multi-level external calibration using isotopically labelled internal standards, multi-level and single level standard addition, and two ways of single-point internal calibration: one point isotopic internal calibration (OPIC) and isotope pattern deconvolution. It was concluded that if no isotopically labeled standards are available, one-level standard additions was the most efficient option.

ÍNDICE GENERAL / *TABLE OF CONTENTS*

Objetivos y plan de trabajo	1
<i>Objectives and working plan</i>	5

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1	Introducción	11
1.2	Análisis por Dilución Isotópica	15
1.2.1	Compuestos marcados isotópicamente	17
1.2.2	Espectrometría de masas de dilución isotópica	20
1.2.3	Deconvolución de perfiles isotópicos	24
1.3	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	28
1.3.1	Tratamiento de muestra	28
1.3.2	Cromatografía líquida	31
1.3.3	Espectrometría de masas	34
1.3.4	Acoplamientos LC-MS	40
1.3.5	Validación de métodos	45
1.4	Bibliografía	49

CAPÍTULO 2: DETERMINACIÓN DE CROMO EN MUESTRAS SÓLIDAS MEDIOAMBIENTALES

2.1	Introducción	57
2.2	Método rápido y exacto para la determinación de Cr(VI) en muestras sólidas basado en espectrometría de masas de dilución isotópica	65
2.2.1	Artículo científico 1	
	<i>Fast and Accurate Procedure for the Determination of Cr(VI) in Solid Samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry</i>	73
2.3	Bibliografía	101

CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE DISRUPTORES ENDOCRINOS EN AGUAS MEDIOAMBIENTALES

3.1	Introducción	105
3.2	Determinación de nonilfenol en aguas por dilución isotópica haciendo uso de su análogo marcado isotópicamente con un solo carbono-13	113
3.2.1	Artículo científico 2	
	<i>Fast methodology for the reliable determination of nonylphenol in water samples by minimal labeling isotope dilution mass spectrometry</i>	121
3.3	Desarrollo y validación de un método para la cuantificación de alquilfenoles por espectrometría de masas de dilución isotópica	147

3.3.1 Artículo científico 3	
<i>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</i>	153
3.4 Comparación de métodos de extracción convencionales (SPE) y no convencionales (HF-LPME) para la determinación de disruptores endocrinos en aguas	183
3.4.1 Artículo científico 4	
<i>Comparison of solid phase extraction and hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of endocrine disrupting compound by mass spectrometry and isotope pattern deconvolution</i>	189
3.5 Bibliografía	215

CAPÍTULO 4: ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ Y DE SU CORRECCIÓN EN EL ANÁLISIS DE MICOTOXINAS

4.1 Introducción	221
4.2 Comparación de distintas estrategias para contrarrestar el efecto matriz en el análisis de micotoxinas en alimentos y piensos	229
4.2.1 Artículo científico 5	
<i>Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed</i>	239
4.3 Bibliografía	275

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Conclusiones	281
Sugerencias para trabajos futuros	285
<i>Conclusions</i>	287
<i>Future perspectives</i>	291
Artículos científicos relacionados con la tesis	293
Agradecimientos	295

Acrónimos y abreviaturas

AAS	Espectrometría de absorción atómica
AFB₁	Aflatoxina B1
APCI	Ionización química a presión atmosférica
APEO	Alquilfenol etoxilatos
ASE	Extracción acelerada de disolventes
BPA	Bisfenol A
CRM	Material de referencia certificado
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DEHP	Bis (2-etilhexil) ftalato
DON	Deoxinivalenol
EDC	Compuestos Disruptores Endocrinos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EI	Ionización electrónica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EPA	Agencia estatal para la protección del medioambiente de los Estados Unidos
EQS	Parámetros de calidad mediambiental
ESI	Ionización por electrospray
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura
FB₁	Fumonisina B1
FB₂	Fumonisina B2
FB₃	Fumonisina B3
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
HF-LPME	Microextracción en fase líquida soportada en membranas huecas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HRMS	Espectrometría de masas de ultra resolución
HT-2	Toxina HT-2
IC	Cromatografía de intercambio iónico
ICP	Plasma de acoplamiento inductivo
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo
ICP-MS	Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
IDA	Análisis por dilución isotópica

IDMS	Espectrometría de masas de dilución isotópica
IL-IS	Patrón interno marcado con un isótopo estable
LA-FTICRMS	Ablación láser acoplada a la espectrometría de masas de resonancia de ión ciclotrón con Transformada de Fourier
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LLE	Extracción líquido-líquido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LPME	Microextracción en fase líquida
m/z	Relación masa/carga
MAE	Extracción asistida mediante microondas
ME	Efecto matriz
MIP	Polímeros de impresión molecular
mM	Mili molar
MS	Espectrometría de masas
NP	Nonilfenol
OP	Octilfenol
OPIC	Calibrado interno utilizando un punto
OTA	Ocratoxina A
PCBs	Policlorobifenilos
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVC	Policloruro de vinilo
Q	Analizador de iones cuadrupolar o cuadrupolo
QqQ	Analizador de tripe cuadrupolo
RMN	Resonancia magnética nuclear
RPLC	Cromatografía líquida de fase inversa
SBSE	Extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras
SDME	Microextracción en gota
SFE	Extracción con fluidos supercríticos
SIM	Monitorización selectiva de iones
SPE	Extracción en fase sólida
SRM	Monitorización de la transición seleccionada
SSIDMS	Espectrometría de masas de dilución isotópica específica en cuanto a la especie
T2	Tóxina T-2

TCLP	Procedimiento de lixiviación característica de la toxicidad
TIMS	Espectrometría de masas con fuente de ionización térmica
TLC	Cromatografía en capa fina
TOF	Detector de tiempo de vuelo
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución
USGS	Servicio Geológico de los Estados Unidos
UV	Ultravioleta
WHO	Organización mundial de la salud
ZEA	Zearalenona

Objetivos y plan de trabajo



Objetivos

El **principal objetivo** de la presente Tesis doctoral ha sido el desarrollo de nueva metodología analítica basada en la cuantificación mediante espectrometría de masas de dilución isotópica (IDMS) y en el procedimiento de cálculo de deconvolución de perfiles isotópicos (IPD). Para ello, se ha hecho uso del acoplamiento entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas tanto atómica como molecular. Este objetivo principal se puede desglosar en los siguientes **objetivos específicos**:

-Determinación de especies de cromo:

1. Desarrollar un método para la extracción de Cr(III) y Cr(VI) en muestras sólidas medioambientales empleando como disolución extractora medio básico y agentes complejantes.
2. Puesta a punto de un método de separación y detección de Cr(III) y Cr(VI) por cromatografía líquida de intercambio aniónico y detección mediante ICP-MS.
3. Validación de la metodología desarrollada mediante el uso de materiales de referencia certificados y ensayos con diferentes muestras medioambientales.
4. Cuantificar mediante la técnica de dilución isotópica específica, concretamente con la aproximación matemática de deconvolución de perfiles isotópicos, y comprobar su validez en la corrección de las posibles interconversiones que puedan ocurrir.

-Determinación de disruptores endocrinos

5. Desarrollar nuevos métodos LC-MS/MS basados en IDMS y cálculos IPD para la determinación de compuestos orgánicos emergentes seleccionados usando patrones marcados con ^{13}C .
6. Sintetizar y caracterizar algunos compuestos orgánicos seleccionados marcados con ^{13}C .

7. Estudiar el problema del efecto matriz para los compuestos seleccionados en muestras complejas, incluyendo agua residual. Asimismo, estudiar la eficacia en su eliminación mediante el uso de los patrones marcados y la presencia o no de efecto isotópico.
8. Desarrollar y optimizar distintos métodos de extracción para los compuestos seleccionados en muestras de agua.
9. Validar los métodos desarrollados para los analitos seleccionados mediante ensayos de fortificación de muestras de agua de consumo y medioambientales (agua residual antes y después de la depuración, aguas de consumo y aguas superficiales).
10. Desarrollar métodos de cálculo y cuantificación automatizados basados en hojas de cálculo fácilmente adaptables a las condiciones de trabajo de cualquier laboratorio de análisis de rutina.
11. Comparar las características analíticas de los nuevos métodos desarrollados con los métodos de cuantificación tradicionales.

-Determinación de micotoxinas

12. Adaptar métodos previamente desarrollados para la determinación de micotoxinas en alimentos mediante IDMS convencional y LC-MS/MS a la metodología de cálculo basada en IPD.
13. Estudiar la magnitud del efecto matriz asociado a la ionización por electrospray mediante distintas aproximaciones.
14. Comparar distintas estrategias de cuantificación en la determinación de micotoxinas en alimentos y piensos.

Plan de trabajo

El plan de trabajo seguido para llevar a cabo los objetivos establecidos en la presente tesis se pueden resumir del siguiente modo:

-Determinación de especies de cromo:

1. Revisión bibliográfica sobre los métodos de análisis existentes para estos compuestos mediante la técnica de IC-ICP-MS.
2. Desarrollo y optimización de la detección mediante ICP-MS, así como del método de separación por intercambio aniónico. Comprobación del efecto sobre la cromatografía de la matriz introducida en diferentes medios extractores-complejantes.
3. Evaluación de distintos extractantes y condiciones óptimas para la extracción de las distintas especies de cromo, basados en disoluciones extractoras básicas y reactivos complejantes.
4. Aplicación de la cuantificación mediante IPD y validación de la metodología con materiales de referencia.

-Determinación de disruptores endocrinos

5. Realización de una consulta bibliográfica para la selección de los compuestos objeto de estudio en base a algunos de los siguientes criterios: legalmente controlados, emergentes, determinables mediante HPLC-ESI-MS/MS, disponibilidad de patrones marcados isotópicamente, toxicidad para humanos y/o medio ambiente, uso o presencia conocida de estos compuestos en el medio ambiente.
6. Desarrollo de rutas de síntesis para obtener nuevos compuestos con un solo ^{13}C . Esta etapa implica obtener rutas de síntesis con el menor número de etapas posible, así como la síntesis y la caracterización exhaustiva de los compuestos obtenidos.

7. Optimización de las condiciones de MS/MS y de la separación cromatográfica para los compuestos objeto de estudio.
8. Desarrollo de las ecuaciones de deconvolución de perfiles isotópicos para espectrometría de masas en tándem (QqQ) aplicada a los diferentes compuestos.
9. Estudio del patrón de fragmentación de los compuestos natural y marcado.
10. Comprobación de la extensión del etiquetado isotópico de los compuestos marcados.
11. Puesta a punto de la metodología de extracción de los compuestos en matrices acuosas.
12. Desarrollo y optimización de nueva metodología LC-(ID)MS/MS mediante IPD para la determinación de los compuestos objeto de estudio.
13. Validación de los métodos desarrollados y optimizados evaluando la exactitud y precisión mediante ensayos de recuperación a varios niveles de concentración.

-Determinación de micotoxinas

14. Selección de las micotoxinas a estudiar en base a diversos criterios: presencia en las matrices seleccionadas, inclusión en la legislación vigente, disponibilidad de sus análogos enriquecidos isotópicamente con ^{13}C .
15. Desarrollo de métodos de cálculo y cuantificación automatizados haciendo uso de la metodología de IDMS e IPD para cada compuesto seleccionado.
16. Evaluación de la extensión del efecto matriz mediante distintas aproximaciones, tanto cuantitativas como cualitativas.
17. Comparación de distintas metodologías de cálculo para la compensación del efecto matriz en el análisis de las micotoxinas seleccionadas.

Objectives

The **main objective** of this Doctoral Thesis is to investigate the development and validation of new analytical methodologies based on Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) and Isotope Pattern Deconvolution (IPD), in combination with liquid chromatography coupled to mass spectrometry. This main objective can be broken down into the following **specific objectives**.

-Determination of chromium species:

1. Development of an extraction procedure for the simultaneous extraction of Cr(III) and Cr(VI) in environmental solid samples by means of a basic extractant solution and the addition of complexing agents.
2. Optimization of chromatographic conditions for the separation of Cr(III) and Cr(VI) based on anion-exchange liquid chromatography and ICP-MS.
3. Validation of the developed methodology evaluating different certified reference materials.
4. Quantification by means of double spike IDMS using the mathematical approach based on Isotope Pattern Deconvolution. The proper correction of species interconversion must be also checked.

-Determination of endocrine disrupting compounds:

5. Development of a new analytical methodology for the determination of selected emerging organic pollutants by UHPLC-MS/MS with triple quadrupole based on IDMS and IPD calculations and ^{13}C -labelled internal standards.
6. Selection, synthesis and characterization of the corresponding minimal labeled ^{13}C -analogues for some selected compounds.
7. Evaluation of matrix effects in quantitative LC-MS/MS methods for complex waters samples, including wastewater. Study of correction of matrix effects with the use of isotope-labeled internal standards and possible isotopic effects in the sought compounds.

8. Optimization of different extraction procedures for the extraction of the selected compounds in water samples.
9. Validation of the developed methods in drinking water, surface water and wastewater from recovery experiments at different concentration levels.
10. Development of automatized spreadsheets for the IPD calculations (mostly with LINEST function of Microsoft Excel) for routine laboratories purposes.
11. Comparison of the developed IPD methodologies with other classical quantification techniques.

-Determination of mycotoxins:

12. Adaptation of previously developed methodologies for the determination of mycotoxins in food and feed based on classical IDMS and LC-(ID)MS/MS to IPD.
13. Study of different matrix evaluation approaches in order to compensate for and quantify the matrix effect due to electrospray ionization sources.
14. Comparison of different quantification strategies for the accurate quantification of mycotoxins in food and feed.

Working plan

The working plan followed in order to carry out the stated objectives is summarized as follows.

-Determination of chromium species:

1. Bibliographic revision of the state-of-the art on the existing methodologies concerning chromium species by ion chromatography and ICP-MS.
2. Development and optimization of ICP-MS parameters and chromatographic conditions. Testing of the effect of sample matrix extracts in chromatography separation with different complexing agents in the media.
3. Evaluation of different extracting conditions and complexing-stabilizing agents in basic conditions.
4. Application of the develop IPD methodology and the optimized extracting conditions for the validation with certified reference materials.

-Determination of endocrine disrupting compounds:

5. Selection of the endocrine disrupting compounds to be investigated by conducting a bibliographic revision based on the following criteria: legally controlled, compatible with LC-MS determinations, contaminants of emerging concern, availability of the isotopically labeled internal standards and/or occurrence in the environment.
6. Development of fast routes of synthesis for singly ^{13}C -labeled analogues. This research concerns the study of routes which requires the minimum number of steps and the synthesis and complete characterization of synthesized compounds.
7. Optimization of the MS/MS conditions for quantification purposes and of the chromatographic separation (by UHPLC) for the target compounds.

8. Development of the IPD equations for tandem mass spectrometry (QqQ) and its application for the selected EDC.
9. Study of the fragmentation pattern (cluster purity) in both natural and isotopically labeled compounds.
10. Calculation of the extent of the $^{13}\text{C}_1$ enrichment in the synthesized analogues.
11. Optimization and comparison of different extraction techniques in water samples.
12. Development and optimization of new IPD-based quantification in LC-(ID)-MS/MS methodologies for the selected compounds.
13. Validation of the developed methodologies in water samples by recovery studies at different fortication levels.

-Determination of mycotoxins:

14. Selection of the target mycotoxins based on the following criteria: occurrence in the selected matrices, availability of the isotopically labeled internal standards and/or legally controlled.
15. Development of automatized spreadsheets based on IPD calculations and IDMS for the quantification of the selected mycotoxins.
16. Evaluation of the extent of matrix effect by both quantitative and qualitative approaches.
17. Comparison of different quantification methodologies in order to compensate matrix effect in LC-MS/MS mycotoxins analysis in the selected matrices.

Capítulo 1

Introducción general



1.1 Introducción

Una de las principales preocupaciones de la sociedad actual es mantener un buen estado de salud, no interferido ni por contaminantes medioambientales ni alimenticios, así como de ningún otro tipo. Este hecho ha derivado en que cada vez haya una mayor demanda de información sobre cuál es la composición del mundo que nos rodea. Por ello cada vez aumenta más la necesidad de obtener resultados rápidos, precisos y fiables sobre las cantidades de compuestos que puedan afectar de forma negativa a nuestro organismo. En el campo de la química analítica esto se traduce en el continuo desarrollo de metodologías de análisis que faciliten la complicada tarea de controlar y gestionar las distintas fuentes de contaminación con las que estamos en contacto.

La Organización Mundial de la Salud (WHO, *World Health Organization*) es la agencia especializada de las Naciones Unidas encargada de gestionar los temas de salud a escala mundial. Nacida el 7 de abril de 1948 en Ginebra (Suiza), su misión principal radica en ayudar a cualquier persona necesitada de ayuda sanitaria. Además parte de su labor también incluye la coordinación y mejora de los temas relacionados con la seguridad alimentaria así como con el control de la salud pública y el medio ambiente. Estos dos puntos fueron recogidos en el último plan bianual 2012-2013 de presupuesto por programas¹ de la WHO de la siguiente manera:

- *"To promote a healthier environment, intensify primary prevention and influence public policies in all sectors so as to address the root causes of environmental threats to health"*

- *“To improve nutrition, food safety and food security, throughout the life-course, and in support of public health and sustainable development”*

La principal función de este documento, así como en la nueva propuesta para los años 2014-2015², es establecer toda una serie de objetivos estratégicos que deben ser aplicados en las políticas de sanidad de todos los países.

En la actualidad, una cuarta parte de las enfermedades son producidas por causas ambientales y se estima que producen hasta 13 millones de muertes al año. Los principales factores de riesgo que las originan son los agentes químicos, la radiación, la falta de agua y sanidad, la contaminación atmosférica y el cambio climático. Entre los agentes químicos medioambientales se incluyen, entre otros, a los pesticidas, metales pesados, fármacos, dioxinas, plastificantes, retardantes de llama, etc.

Dada su presencia generalizada y potenciales efectos, los grupos de compuestos detallados anteriormente constituyen uno de los campos de mayor interés de la Química Analítica. Dentro de este marco general, el grueso de la presente tesis lo constituye el desarrollo de métodos de análisis de carácter medioambiental para determinados compuestos escogidos. Así, en el campo de la determinación de metales pesados se aborda, en el segundo capítulo, el desarrollo un método para la correcta cuantificación en suelos de un metal tóxico y carcinogénico: el cromo (VI). Por otra parte, el tercer capítulo engloba el análisis de compuestos con capacidad disruptora endocrina (EDC), en otras palabras, compuestos capaces de mimetizar a las hormonas de nuestro organismo e interferir en su correcto funcionamiento. Este tercer capítulo incluye el análisis de dos alquilfenoles (nonilfenol (NP) y t-octilfenol (OP)) así como de bisfenol A (BPA) en aguas embotelladas y medioambientales.

En materia de alimentación, la Organización Mundial de la Salud trabaja conjuntamente con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en su afán por reducir las carencias alimenticias de forma global. Dentro de sus acciones existen diversos programas encargados

de asegurar la inocuidad y calidad de los alimentos. Entre los principales riesgos alimentarios a los que la sociedad se encuentra expuesta se incluyen la contaminación microbiológica, los residuos de pesticidas, el abuso de aditivos alimentarios, los contaminantes químicos (incluyendo las toxinas naturales) y la adulteración³. De forma general, los alimentos están expuestos a cualquiera de los agentes medioambientales citados anteriormente. Estos agentes se caracterizan porque sus efectos en la salud suelen aparecer a largo plazo por lo que es necesario un estricto control de ellos a niveles de concentración muy bajos.

Uno de los grupos de contaminantes químicos de origen biológico que implican un mayor riesgo durante la alimentación son las micotoxinas. Estas están producidas por diferentes especies de hongos y destacan por ser altamente tóxicas y carcinogénicas. Casi todas las plantas pueden servir como sustratos para la proliferación de hongos, pudiendo así ocasionar contaminación en los alimentos tanto de personas como de animales. Este grupo de toxinas será tratado en el cuarto capítulo de esta tesis, donde se incluye un método multiresidual en el que se analizan las micotoxinas deoxinivalenol, ocratoxina, fumonisinas, zearalenona y las toxinas T-2 y HT-2 en muestras de alimentos. Las micotoxinas seleccionadas son las reguladas por la Unión Europea, aunque se excluyeron dos tipos de micotoxinas: la aflatoxina M1 y la patulina. Esto se debe a que la primera sólo aparece en productos lácteos mientras que patulina sólo se ha detectado en derivados de la manzana. Además, tanto la patulina como la aflatoxina M1 exigen de tratamientos de muestra distintos al resto de las micotoxinas, por lo que es necesario cuantificarlas de forma independiente.

La determinación de los compuestos seleccionados tanto en materia medioambiental como alimentaria precisa de métodos altamente fiables, precisos, exactos y que permitan cuantificar de forma inequívoca a niveles de concentración muy bajos, del orden de las ppb. La escasez de métodos rápidos, sencillos y con alta calidad metrológica para los compuestos seleccionados ha sido el principal impulso para el desarrollo de la nueva metodología analítica

incluida en esta tesis. Para ello se ha aplicado una forma de cuantificación aún poco habitual basada en la dilución isotópica: la deconvolución de perfiles isotópicos (IPD, *Isotope Pattern Deconvolution*). Por otra parte, la separación y consiguiente cuantificación de los compuestos seleccionados se ha llevado a cabo combinando el uso de la cromatografía líquida de alta resolución junto a la detección mediante espectrometría de masas. Finalmente, en algunos casos, se han aplicado métodos de tratamiento de muestra poco convencionales. La diferente metodología desarrollada se explica de forma más extensa en los siguientes apartados.

1.2 Análisis por Dilución Isotópica

El Análisis por Dilución Isotópica (IDA, *Isotope Dilution Analysis*) es una técnica bien conocida para la determinación exacta tanto de elementos como de especies elementales, así como de compuestos orgánicos. Su desarrollo comenzó alrededor de 1950 en el campo de análisis elemental y a partir de 1970 se extendió abarcando también el análisis de compuestos orgánicos⁴. Dado que la medida de la señal de los distintos isótopos se realiza mediante espectrómetros de masas, el IDA suele identificarse como espectrometría de masas de dilución isotópica (IDMS, *Isotope Dilution Mass Spectrometry*).

En un primer momento la IDMS de compuestos inorgánicos se realizó mediante espectrometría de masas con fuente de ionización térmica (TIMS, *Thermal Ionization Mass Spectrometry*) pero con el paso de los años se instauró el uso de instrumentos con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS; *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*). Por su parte, el IDA de compuestos orgánicos se ha realizado con distintos tipos de instrumentos acoplados a espectrómetros de masas simples con cromatografía de gases (GC-MS) y líquida (LC-MS) e incluso con instrumentos que unen la cromatografía con detectores de masas en tándem (MS/MS).

De forma general, la dilución isotópica se caracteriza por permitir la corrección de la mayoría de los errores sistemáticos, incluyendo extracciones no cuantitativas, separaciones poco eficaces, derivas de señal, etc. Sin embargo, su mayor ventaja radica en su alta calidad metrológica comparada con los métodos tradicionales de adiciones estándar y el uso de curvas de calibrado externos e internos⁵.

El IDA está basado en la alteración intencionada de las abundancias isotópicas naturales de un elemento en una muestra mediante la adición de cantidades conocidas de este mismo elemento enriquecido en otros isótopos (trazador enriquecido isotópicamente o *spike*)⁶. De esta forma se obtiene un perfil

isotópico mezcla de las abundancias tanto de la muestra como del trazador (o trazadores). La forma convencional de ilustrar el concepto de dilución isotópica se presenta en la Figura 1.1, donde se observa el proceso de mezcla para un elemento con dos isótopos (a y b) cuyas abundancias naturales (Muestra) y enriquecida (Trazador) son claramente diferentes.

Otra forma de ilustrar el concepto de dilución isotópica es la empleada por Meija et al.⁵. En esta explica que una década antes de que fueran descubiertos los isótopos, los zoólogos ya empleaban una metodología muy similar para estimar la población de peces en estanques. El procedimiento era sencillo: se añadía un número conocido de peces marcados (representados en color rojo en la Figura 1.2) y se esperaba a que se mezclaran con la población del lago. Pasadas unas horas, y cogiendo sólo una parte de la población, se podía estimar fácilmente la población mediante una simple regla de 3. Este cálculo era posible ya que el número de peces marcados añadido era conocido y sólo era necesario conocer la relación entre el número de peces marcados y no marcados de la captura.

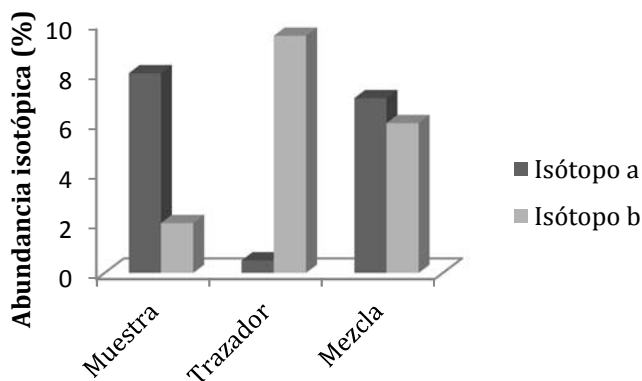


Figura 1.1 Gráfico del principio de la dilución isotópica.



Figura 1.2 Principio de la “dilución isotópica” aplicado a la biología.

En el campo de la química analítica existe, desde finales del siglo XX y hasta la actualidad, una tendencia al alza del uso de metodologías que impliquen la dilución isotópica. Esto se puede observar si se hace uso de los indicadores bibliométricos de las bases de datos de referencias. Por ejemplo, mediante “SCOPUS” se puede evaluar el impacto de las palabras “dilución isotópica” en distintos apartados incluidos publicaciones de científicas. Así se observa que existen un total de 2881 publicaciones que incluyen estos términos (en el título, resumen o palabras clave) y que sólo en 2013 se publicaron 553 que cumplieran estas características.

1.2.1 Compuestos marcados isotópicamente

La primera vez que se utilizaron compuestos enriquecidos isotópicamente en la química analítica fue antes de la primera guerra mundial, cuando György Hevesy and Fritz Paneth utilizaron plomo enriquecido para la determinación de la solubilidad del PbS y $PbCrO_4$ ⁵. Este manuscrito fue la base para conceder el premio Nobel de química de 1943 a Hevesy por su trabajo basado en el uso de isótopos como trazadores para el estudio de procesos químicos. La principal ventaja de su uso en química radica en que siempre y cuando no existan efectos isotópicos, el comportamiento entre el compuesto natural y su análogo marcado isotópicamente será el mismo, pero podrán identificarse a causa de

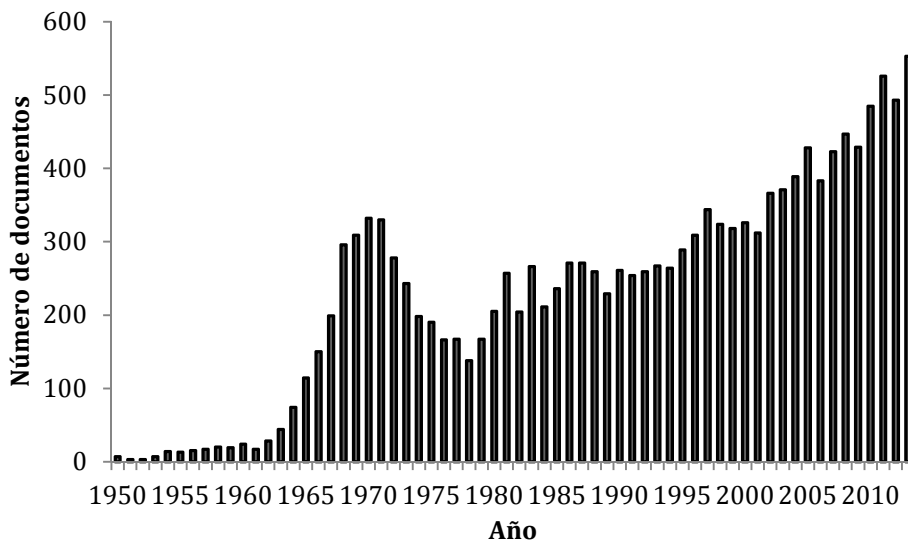


Figura 1.3 Publicaciones sobre dilución isotópica desde el año 1950 y hasta la actualidad.

su diferencia de masa. Por este motivo son considerados como los mejores patrones internos ya que, si se añaden desde el inicio, pueden compensar tanto bajas recuperaciones como corregir las fluctuaciones en los instrumentos de medida.

Existe una gran diversidad de usos de los compuestos marcados isotópicamente que van desde mecanismos en síntesis orgánica⁷, pasando por estudios de procesos medioambientales⁸ hasta estudios farmacocinéticos y de metabolismo⁹. En el caso que concierne a esta tesis su función principal será la de patrones internos, siendo su denominación más común la de patrones internos marcados con un isótopo estable (IL-IS, *Isotope Labelled Internal Standard*). Los primeros trazadores de isótopos estables empleados fueron átomos de elementos metálicos enriquecidos en uno de sus isótopos menos

abundantes. Sin embargo, los más utilizados en la actualidad son los que forman parte de una molécula orgánica, tales como el ^2H , ^{13}C , ^{15}N y el ^{37}Cl .

Junto a las ventajas descritas anteriormente, existen una serie de inconvenientes asociados al uso de trazadores isotópicos. En concreto, los problemas ligados al uso de compuestos marcados con deuterio han sido ampliamente descritos en la literatura, ya que estos compuestos son los de menor coste y de mayor disponibilidad. Por ejemplo, si el deuterio se encuentra en una posición lábil de la molécula éste puede intercambiarse con los hidrógenos del disolvente y así sesgar los resultados del análisis¹⁰. Se han observado variaciones en los tiempo de retención cromatográfica^{11,12} e incluso variaciones durante los tratamientos de muestra¹³. La solución más sencilla a estos problemas es el uso de IL-IS que tengan parte de los carbonos ^{12}C sustituidos por ^{13}C ya que al formar parte de la estructura de la molécula son más estables. Además, la diferencia de masa por cada átomo de deuterio añadido es el doble (pasa de 1 uma a 2) mientras que intercambiando un ^{12}C por un ^{13}C sólo aumenta 1/13 uma la masa del átomo. Por ello, para reducir posibles diferencias de comportamiento asociados a la diferencia de masa introducida, la tendencia actual es utilizar compuestos enriquecidos con ^{13}C . A su vez, se tiende a dotar de un gran número de carbonos sustituidos por ^{13}C a los patrones internos, para evitar así otros problemas ligados a la no-linealidad de las curvas de calibrado. Por otro lado, aunque aún no ha sido descrito el efecto, en teoría cabe la posibilidad de que un elevado número de ^{13}C implique la aparición de efecto isotópico de la misma forma que ocurre con los compuestos deuterados. Para evitar dicha posibilidad una solución es el uso de compuestos marcados isotópicamente en un solo ^{13}C (*minimal labelling*). Teniendo en cuenta que la disponibilidad de compuestos marcados con diversos ^{13}C aún es baja y que casi no existen compuestos comerciales con un solo ^{13}C , su uso implica indefectiblemente su síntesis. En conclusión, los principales inconvenientes son la baja disponibilidad de los IL-IS y su elevado precio en comparación con otros patrones internos clásicos¹⁴.

1.2.2 Espectrometría de masas de dilución isotópica

La inmensa mayoría de trabajos publicados que hacen uso de la espectrometría de masas de dilución isotópica para determinar compuestos orgánicos, al contrario que en análisis elemental, suelen emplear curvas de calibrado en las que los compuestos marcados isotópicamente hacen la función de patrones internos⁶. Para cuantificar a los compuestos de interés analítico en la muestra, la ecuación de la recta se obtiene representando la relación de señales entre ambos frente a la concentración del natural. En éstas, para que no exista contribución del IL-IS en la señal de patrón natural y evitar ecuaciones no-lineales es necesario por lo menos una diferencia de 3 unidades de masa atómica entre ambos¹⁵.

También existe la posibilidad de realizar cuantificaciones por IDMS sin curva de calibrado. La forma clásica de cálculo, desarrollada para la determinación elemental, implica la medida de la relación isotópica entre el elemento marcado y el natural en la mezcla, mediante la ecuación (1).

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

Como se puede observar, para obtener la concentración de analito en la muestra (c_s) sólo se necesita conocer la relación entre los isótopos a y b en la mezcla R_m , que puede ser medida fácilmente con un espectrómetro de masas. El resto de variables de la ecuación son conocidas siendo c_t la concentración de trazador, m_t la cantidad añadida de éste y M_t su masa atómica. De la misma forma ocurre con el elemento de composición isotópica natural, siendo el peso de la muestra m_s y la masa atómica del elemento natural M_s . Finalmente, las abundancias isotópicas del isótopo b en el trazador A_t^b , del isótopo a en la muestra A_s^a y las relaciones isotópicas de estos $R_t = A_t^a/A_t^b$ y $R_s = A_s^b/A_s^a$ son también previamente conocidas. El desarrollo matemático de este cálculo puede ser consultado en otras fuentes^{16,17}.

El tercer tipo de cuantificación mediante IDMS también evita la curva de calibrado y se conoce como deconvolución de perfiles isotópicos (IPD, *Isotope Pattern Deconvolution*). Esta metodología de cálculo se diferencia de la anterior en que hace uso de abundancias en vez de relaciones isotópicas. Su desarrollo matemático se puede consultar en el siguiente subapartado.

El uso de la dilución isotópica, en cualquiera de las tres aproximaciones descritas, conlleva elevadas precisión y exactitud que convierten a éstas en metodologías de referencia. En primer lugar, al trabajar con relaciones isotópicas se corrigen las variaciones instrumentales de la señal. Además una vez se ha alcanzado el equilibrio isotópico entre la muestra y el trazador, cualquier pérdida de muestra no va a tener ninguna influencia en el resultado final. Estas ventajas hacen que IDA se considere un método primario de análisis trazable directamente al Sistema Internacional de unidades (posee alta calidad metrológica)⁶. Finalmente, la aplicación de IDA sólo requiere medir las relaciones isotópicas de los elementos y compuestos lo cual se puede realizar con una elevada exactitud y precisión mediante un espectrómetro de masas.

Sin embargo, existen una serie de requisitos que deben cumplirse para obtener resultados fiables mediante dilución isotópica. El principal de ellos es la necesidad de que el elemento presente en la muestra y el trazador enriquecido isotópicamente añadido deben comportarse de una manera idéntica. Es decir, no deben existir efectos isotópicos a lo largo del proceso de tratamiento de muestra y medida instrumental. Por otro lado debe asegurarse que se alcanza el *equilibrio isotópico*. Esto es especialmente problemático en sistemas con diversas fases, tales como los suelos (que requieren tratamientos de muestra más complejos). Para que la determinación sea correcta el equilibrio isotópico se consigue tras la extracción completa del analito de la matriz, y su homogeneización con el líquido extractante, pero antes de que ocurra ninguna degradación y/o interconversión del mismo. Por tanto, el comportamiento de trazador y analito debe ser idéntico durante todo el proceso analítico. Por otra parte, debe confirmarse la estabilidad de los patrones marcados utilizados

(trazadores) caracterizándolos de forma periódica (normalmente por dilución isotópica inversa) (apartado 1.2.3) y corregir la discriminación de masas (ver apartado 1.3.4) en el caso de análisis elemental. Finalmente, la medida de las intensidades de los isótopos a y b realizada por el espectrómetro de masas debe estar libre de interferencias espectrales (apartado 1.3.3) y debe hacerse un control exhaustivo de los valores del blanco ya que cualquier tipo de contaminación que afecte a la muestra isotópicamente diluida conducirá a valores erróneos. Se suma a todo lo anterior el inconveniente del elevado precio de los trazadores isotópicos, como ya se ha comentado anteriormente.

Selección de compuestos marcados isotópicamente

Existen una serie de consideraciones a tener en cuenta cuando se trata de elegir un trazador isotópico ya sea en IDMS atómica o molecular. Entre ellas cabe destacar el coste, la estabilidad, la posible presencia de efectos isotópicos y la potencial consecuencia sobre la linealidad de la curva de calibrado.

A efectos teóricos, teniendo en cuenta la teoría de propagación de errores⁶, el mejor trazador para IDMS elemental es aquel con una mínima abundancia del isótopo mayoritario natural y con el máximo enriquecimiento en otro de los isótopos disponibles. En cuanto a la IDMS molecular, todos los trazadores utilizados (enriquecidos en ^2H o ^{13}C principalmente) presentan muy baja abundancia en el isótopo de mayor abundancia natural (y viceversa) por lo que no es necesario tener en cuenta el factor estadístico.

En el caso de la IDMS elemental es requisito indispensable tener en cuenta tanto a las interferencias isobáricas como a las poliatómicas. Un ejemplo de interferencia isobárica aparece en el caso de la cuantificación de Cr mediante dilución isotópica. En ésta no es aconsejable utilizar como trazador el ^{54}Cr ya que suele existir contaminación por hierro en los instrumentos de medida, cuyo segundo isótopo más abundante es el ^{54}Fe . Es cierto que estas interferencias pueden separarse mediante cromatografía, pero se recomienda utilizar cualquiera de los otros isótopos disponibles para el analito objetivo. En

cuanto a las interferencias poliatómicas, éstas pueden aparecer por combinación de átomos en la fuente ICP para formar un compuesto con la misma relación masa/carga que el isótopo de interés. Están formadas principalmente por combinaciones de elementos de la matriz con OH, oxígeno o argón. Un ejemplo es el $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$ que interfiere también con el ^{54}Cr . Como se verá en el apartado 1.3.3 pueden ser reducidas e incluso eliminadas mediante el uso de celdas de colisión.

Optimización de la cantidad de trazador añadida a la muestra

Uno de los factores que más pueden afectar a la correcta cuantificación mediante dilución isotópica es la cantidad de trazador añadida a la muestra. Es posible demostrar mediante la teoría de propagación de errores¹⁸ que esta cantidad puede ser optimizada calculando el intervalo óptimo de la relación muestra/trazador en el que se minimicen los errores estadísticos. Tomando la ecuación (1) y aplicando la teoría de propagación de errores, se puede obtener el factor de magnificación del error $f(R)$ como:

$$f(R) = \left[\frac{R_m(1-R_tR_s)}{(R_m-R_t)(1-R_mR_s)} \right] \quad (2)$$

En esta expresión se observa que $f(R)$ depende de R_m , R_t y R_s . Como R_s y R_t son conocidos, los valores de $f(R)$ se pueden representar frente a R_m para obtener el intervalo de R_m en el que la magnificación del error sea mínima.

Teniendo en cuenta este intervalo es posible conocer la cantidad de trazador óptima a añadir a la muestra. En la Figura 1.4 se representa la variación de la función de $f(R)$ frente a la relación isotópica $^{52}\text{Cr}/^{50}\text{Cr}$ para un trazador isotópico enriquecido en ^{50}Cr al 95,17%. Como se puede observar, la relación isotópica entre ambos presenta un intervalo óptimo de 0,1 a 8 en el cual el error de la concentración será aproximadamente igual al error de la medida de la relación isotópica. Este cálculo puede ser extrapolado a relaciones entre distintos isotopómeros(o combinaciones de distintos isótopos en una misma

molécula) para el cálculo en IDMS orgánica. De forma general, los intervalos óptimos siempre se encuentran en el rango de relaciones isotópicas que va de 0,1 a 10.

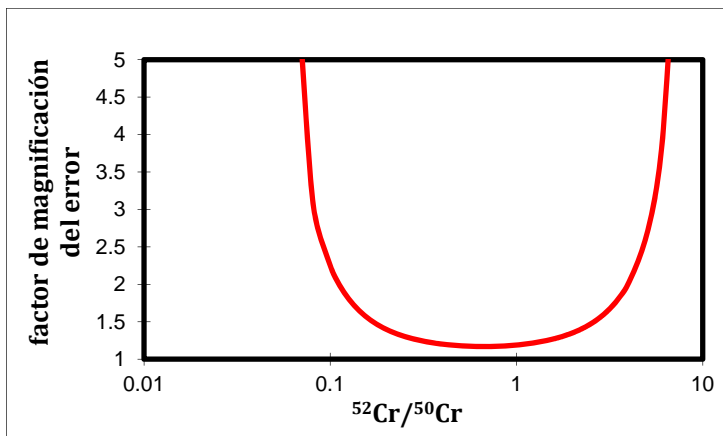


Figura 1.4 Curva de magnificación del error para un trazador isotópico enriquecido en ^{50}Cr .

1.2.3 Deconvolución de perfiles isotópicos

Ya se ha comentado que la dilución isotópica es el proceso de modificación de la composición isotópica (el perfil isotópico) de un elemento en una muestra por adición de un trazador con abundancias isotópicas alteradas (enriquecido en un isótopo poco abundante en el perfil natural). La mezcla es, por tanto, un reflejo de la contribución de cada perfil isotópico. La deconvolución de perfiles isotópicos es una herramienta quimiométrica, basada en ajuste por mínimos cuadrados multivariante, capaz de aislar la contribución de cada perfil (el natural y el trazador o trazadores añadidos) al de la mezcla final. El resultado del cálculo es la fracción molar de cada perfil isotópico en la mezcla.

A continuación se van a deducir las ecuaciones básicas utilizadas en IPD. Como ejemplo se van a utilizar tres perfiles isotópicos elementales distintos: el perfil isotópico natural y los perfiles isotópicos de dos trazadores enriquecidos

isotópicamente, $t1$ y $t2$, que se pueden haber añadido a la muestra en diferentes fases del proceso analítico. El procedimiento usado y las ecuaciones obtenidas se pueden aplicar a cualquier análisis (elemental o molecular) que haga uso de elementos o compuestos marcados isotópicamente.

El balance de moles global en la mezcla, N_m , es:

$$N_m = N_{nat} + N_{t1} + N_{t2} \quad (3)$$

El balance de moles dado en la ecuación (3) se puede calcular para todos los isótopos del elemento. Así, para cada isótopo i .

$$N_m^i = N_{nat}^i + N_{t1}^i + N_{t2}^i \quad (4)$$

La expresión anterior puede ser expresada como una combinación lineal de las abundancias isotópicas y del número de moles.

$$N_m \cdot A_m^i = N_{nat} \cdot A_{nat}^i + N_{t1} \cdot A_{t1}^i + N_{t2} \cdot A_{t2}^i \quad (5)$$

Dividiendo la expresión (5) entre el balance de moles total (3), se obtiene la ecuación en función de las fracciones molares, X .

$$A_m^i = X_{nat} \cdot A_{nat}^i + X_{t1} \cdot A_{t1}^i + X_{t2} \cdot A_{t2}^i \quad (6)$$

Si el elemento considerado contiene n isótopos estables se pueden establecer n ecuaciones distintas como combinación lineal de las abundancias y de las fracciones molares. En forma matricial, se puede expresar como:

$$\begin{bmatrix} A_m^1 \\ A_m^2 \\ A_m^3 \\ \dots \\ A_m^{n-1} \\ A_m^n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^1 & A_{t1}^1 & A_{t2}^1 \\ A_{nat}^2 & A_{t1}^2 & A_{t2}^2 \\ A_{nat}^3 & A_{t1}^3 & A_{t2}^3 \\ \dots & \dots & \dots \\ A_{nat}^{n-1} & A_{t1}^{n-1} & A_{t2}^{n-1} \\ A_{nat}^n & A_{t1}^n & A_{t2}^n \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{t1} \\ X_{t2} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{bmatrix} \quad (7)$$

Donde las abundancias en la mezcla se pueden medir (A_m) y las abundancias naturales y de los trazadores (A_{ti}) se pueden medir o conocer. Los perfiles isotópicos naturales (A_{nat}) están tabulados por la IUPAC y los trazadores pueden venir acompañados de los correspondientes certificados. La matriz anterior se puede resolver y de este modo obtener las fracciones molares de la muestra y de cada uno de los trazadores mediante ajuste por mínimos cuadrados multivariante. Se incluye en la última columna el vector error (e), que se minimiza en el ajuste siempre que se disponga de más ecuaciones que incógnitas ($n > 3$ en este caso). Para ello, se puede aplicar la función "ESTIMACION.LINEAL" del programa EXCEL de Microsoft Office.

Finalmente, dado que la cantidad de moles de trazador añadidos son conocidos, se pueden obtener directamente el número de moles en la muestra (N_{nat}) a partir de la ecuación (8) que se obtiene dividiendo las diferentes fracciones molares.

$$\frac{X_{nat}}{X_{t2}} = \frac{N_{nat}}{N_{t2}} \quad \text{y} \quad \frac{X_{nat}}{X_{t1}} = \frac{N_{nat}}{N_{t1}} \quad (8)$$

Aplicado al análisis de elementos, este tipo de cálculo se puede utilizar tanto para la determinación de metal total como en estudios de especiación. En este último caso, siempre que no existan interconversiones entre las distintas especies. Cuando aparezcan interconversiones (generalmente en la etapa de tratamiento de muestra) se necesitarán balances de masa adicionales que podrán ser consultados en el siguiente capítulo, dedicado a la determinación de especies de Cr.

En análisis molecular, la principal ventaja que ofrece este cálculo, respecto a las curvas de calibrado en las que los trazadores isotópicos son utilizados a modo de patrón interno, es que no le afecta el solapamiento espectral entre compuestos natural y marcado. IPD permite el uso de compuestos marcados isotópicamente con un bajo número de átomos, aproximación conocida como

minimal labelling, no siendo necesaria una diferencia de tres unidades de masa atómica entre ambos. De este modo se minimiza o elimina la posible aparición de efectos isotópicos.

En cualquier caso, puesto que no se necesita realizar una curva de calibrado metodológica se reduce considerablemente el tiempo de análisis total. Sólo es necesaria una única medida de la relación de intensidades (masa/carga) para cuantificar los compuestos de interés la muestra.

Existe sin embargo una clara desventaja en IPD respecto al uso de curvas de calibrado: la necesidad de caracterizar por completo el trazador isotópico empleado durante la cuantificación. Para aplicar correctamente las ecuaciones de IPD es necesario conocer el porcentaje de enriquecimiento de cada isótopo así como la pureza del compuesto¹⁹. Estos datos se incluyen en los certificados (que son la principal causa de su elevado precio). Sin embargo, a menudo contienen datos erróneos, por lo que se recomienda una recharacterización de los trazadores por el propio químico analítico. La forma habitual de comprobar su concentración real es mediante *dilución isotópica inversa*. La dilución isotópica inversa consiste en el uso de patrones de composición natural de concentración perfectamente conocida para obtener la concentración de un trazador enriquecido isotópicamente. A diferencia de la dilución isotópica tradicional, el trazador enriquecido es el objeto de estudio (no el utilizado para cuantificar) y el patrón natural se utiliza para cuantificar, por lo que recibe el nombre de “inversa”. En el caso de los trazadores moleculares es necesario establecer además la pureza espectral para así trabajar con las abundancias correctas, como se verá más adelante.

1.3 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

En la actualidad, existe un continuo desarrollo de métodos de análisis dedicados a la determinación de un gran número de analitos en matrices de alta complejidad, tanto en el campo medioambiental como en el alimentario, entre otros. Si se pretende que sean eficaces y eficientes (como cabe esperar), para todos ellos se debería exigir alta sensibilidad, robustez y bajos tiempos de análisis. Estas características se pueden conseguir mediante el acoplamiento de técnicas de separación de alta resolución a detectores de espectrometría de masas. Este acoplamiento es sencillo cuando se trata de unir la cromatografía de gases a la espectrometría de masas (GC-MS). Sin embargo, cuando el análisis implica el acoplamiento de la cromatografía líquida a la espectrometría de masas (LC-MS) la unión de ambos no es inmediata. En este caso es necesaria una interfaz que compatibilice las condiciones físicas (presión y temperatura) a las que operan ambos instrumentos.

Por otro lado, a pesar de los avances realizados tanto en cromatografía como en espectrometría de masas, el tratamiento de muestra continúa siendo uno de los pasos más importantes durante el proceso analítico, ya que de esta etapa depende en gran medida la fiabilidad del análisis. De forma general, los tratamientos de muestra ideales deben ser rápidos, precisos, exactos, tener bajo coste y asegurar la integridad de los compuestos de interés en la muestra.

1.3.1 Tratamiento de muestra

El primer paso para llevar a cabo un análisis fiable es obtener una muestra homogénea y representativa. Una vez obtenida, y teniendo en cuenta que la mayoría de las muestras no están preparadas para ser introducidas directamente en el instrumento de medida, el siguiente paso es realizar el correspondiente tratamiento de muestra. La preparación de muestra suele ser

uno de los pasos del proceso analítico que requieren de un mayor consumo de tiempo y dependen de la naturaleza de la muestra y del analito, de la matriz y del nivel de concentración al que debe ser realizado el análisis. En función de estos, el tratamiento de muestra puede incluir diversas etapas²⁰. En cada una de ellas el proceso global está sometido a posibles pérdidas o contaminaciones de los analitos de interés. Así, el tratamiento de muestra está considerada una fuente muy importante de error en el proceso analítico.

Entre los tratamientos más habituales se encuentran las extracciones (que compatibilizan a los extractos tanto con las condiciones cromatográficas como con las del detector), las preconcentraciones (que permiten aumentar la señal de los analitos cuando sea necesario) y las derivatizaciones (reacciones para cambiar su forma química). En la presente tesis se ha desarrollado metodología para el análisis de muestras líquidas y sólidas. A continuación se expone un breve resumen de las tendencias actuales para el tratamiento de este tipo de muestras.

En el caso de que los analitos estén contenidos en muestras líquidas, los tratamientos clásicos utilizados van desde simples filtraciones o centrifugaciones, pasando por extracciones líquido-líquido (LLE, *Liquid-Liquid Extraction*), hasta tratamientos más complejos como la microdiálisis (paso de los analitos de un líquido a otro a través de una membrana) o la liofilización (congelación de muestras para seguidamente eliminar el agua que contienen por sublimación). De todas las citadas predomina la aplicación de la LLE. Sin embargo, desde su nacimiento en los años 80, la extracción en fase sólida, SPE (*Solid Phase Extraction*) (ver capítulo 3) se ha consolidado como la forma más utilizada para aislar y concentrar compuestos orgánicos a nivel de trazas en líquidos mediante un material adsorbente. Esta técnica se ha impuesto principalmente por la disminución de disolventes orgánicos necesaria así como su mayor selectividad en comparación con la LLE clásica. Existe una gran cantidad de distintos tipos de sorbentes en SPE en función de las características del analito o analitos, pudiendo incluso ser específicos para un

compuesto en particular mediante el uso de polímeros de impresión molecular (MIP, *Molecularly Imprinted Polymers*). Los MIP, también conocidos como “anticuerpos de plástico”, tienen cavidades específicas para un compuesto en concreto, hecho que los hace altamente selectivos.

Comparadas con las matrices líquidas, las matrices sólidas suelen caracterizarse por requerir tratamientos de muestra mucho más complejos. Normalmente se empieza con un pretratamiento basado en una reducción del tamaño de partícula seguido de la transferencia de los analitos a una fase líquida. Las formas clásicas de extraer los compuestos de interés de muestras sólidas son la extracción sólido-líquido convencional (ver capítulo 4) y la Soxhlet, que permite aumentar la eficiencia de la extracción. El principal inconveniente de ambas es el uso de grandes cantidades de disolventes, que a menudo suelen ser tóxicos. Otras formas de extracción incluyen la aplicación de ultrasonidos o de microondas.

Según encuestas recientes²¹, las tendencias actuales de tratamientos de muestras sólidas están orientadas a la reducción de tiempo y de disolventes. Se ha observado un crecimiento significativo de la aplicación de técnicas de extracción acelerada de disolventes (ASE, *Accelerated Solvent Extraction*), de la extracción con fluidos supercríticos (SFE, *Supercritical Fluid Extraction*) y de la extracción asistida mediante microondas (MAE, *Microwave-assisted extraction*) (ver capítulo 2).

Finalmente, debe destacarse la incidencia que ha tenido la química verde durante las últimas décadas en la química analítica en general y en el tratamiento de muestra en particular. Esta concienciación ambiental se ha plasmado en el desarrollo de técnicas miniaturizadas con mínimos consumos de disolventes, ligadas a tiempos menores de tratamiento de muestra. Una de las técnicas más utilizadas en la actualidad sigue esta línea, la microextracción en fase sólida (SPME), así como otras variantes que utilizan agitadores magnéticos recubiertos de sorbente (SBSE, *Stir-Bar Sorbent Extraction*) que

aportan una mayor superficie de contacto. Otras metodologías hacen uso de unos pocos microlitros de disolvente como fase aceptora de los analitos (LPME, *Liquid Phase Microextraction*). Variantes de esta metodología incluyen el uso de una única gota de solvente como aceptor (SDME, *Single-drop microextraction*) o el uso de membranas capilares de fibra hueca como soporte de la fase aceptora (HF-LPME, *Hollow Fiber Liquid Phase microextraction*) (ver capítulo 3). Publicaciones recientes²² demuestran que cada vez son más y más diversas las posibles aplicaciones de los tratamientos de muestra miniaturizados.

1.3.2 Cromatografía líquida

El gran desarrollo de la cromatografía en las últimas décadas está causado en gran medida por la introducción de una técnica altamente versátil conocida como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *High-Resolution Liquid Chromatography*)²⁰. La cromatografía líquida consiste en la separación de los distintos componentes de una mezcla causada por la distinta afinidad de estos entre la fase estacionaria y la fase móvil líquida. Combinada con la espectrometría de masas, constituye una herramienta de análisis muy potente ya que ofrece la posibilidad de resolver problemas que no se pueden solucionar mediante el espectrómetro de masas, tales como las interferencias isobáricas (o con la misma relación masa/carga m/z que el analito) o elevadas cargas de matriz. De esta forma es posible evitar desde cuantificaciones erróneas hasta la pérdida completa de la señal del compuesto.

La forma más utilizada para clasificar a los distintos tipos de cromatografía líquida tiene en cuenta el tipo de interacción entre el analito y la fase estacionaria²³. De esta forma la clasificación general se divide en fase normal, fase inversa, intercambio iónico y exclusión.

La mayoría de las separaciones cromatográficas pueden ser optimizadas mediante el paso de condiciones isocráticas (o introducción de una fase móvil

de composición constante) al uso de gradientes. Éste segundo se basa en la combinación de diversos disolventes a los cuales se les varía su proporción en función del tiempo. En los trabajos incluidos en esta tesis se utilizaron la cromatografía de fase inversa y la de intercambio iónico, por lo que estas modalidades van a ser descritas de forma más extensa a continuación.

Cromatografía líquida de fase inversa

La cromatografía por fase inversa (RPLC, *Reversed Phase Liquid Chromatography*) se lleva a cabo con columnas en las que la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Se estima que más del 65% de las aplicaciones de HPLC se llevan a cabo mediante fase inversa. Los principales motivos son su simplicidad, versatilidad y el amplio ámbito de aplicación de los métodos por fase inversa²⁰.

Los tipos de empaquetamientos de columna más utilizados incluyen a los ligandos octadecil silano (ODS o C₁₈), octil (C₈), fenilo y al cianopropilo, que se encuentran químicamente ligados a partículas de sílice microporosas. No obstante, no todos los grupos silanol reaccionan con ligandos, hecho que puede empeorar la separación cromatográfica. Para evitar este problema, los grupos de silanol libres se hacen reaccionar con una cadena alquílica corta, normalmente de tipo -CH₃, proceso conocido como *end-capped*.

Los disolventes más comunes en RPLC son el metanol, el acetonitrilo y el tetrahidrofurano que se utilizan en gradientes binarios, ternarios o cuaternarios con agua. Estos disolventes suelen incluir como modificadores pequeñas concentraciones de distintos tampones, del orden de milimolar (mM), principalmente de acetato o de formiato amónico a diferentes pH. De esta forma es posible conseguir mejores formas de pico así como mejorar la señal en el detector de masas.

Las características de la cromatografía líquida, principalmente para RPLC, se vieron altamente incrementadas cuando en el año 2004 la compañía *Waters*©

lanzó las columnas de UHPLC (*Ultra-high Performance Liquid Chromatography*). Este nuevo tipo de columnas se caracteriza por emplear tamaños de partícula inferiores a 2- μm , que aunque generan presiones de trabajo elevadas (del orden de los 15000 psi o 1000 bar) disminuyen de forma considerable el tiempo de separación. Esto también permite aumentar la eficiencia de las separaciones, obteniendo picos cromatográficos más estrechos. Además, se ahorra hasta el 80% de la cantidad de fase móvil necesaria para realizar la separación a pesar de que el flujo utilizado es generalmente mayor. A modo de ejemplo, una separación típica de 30 minutos en HPLC puede ser realizada en unos 4 minutos mediante UHPLC.

Cromatografía de intercambio iónico

La cromatografía de intercambio iónico (IC, *Ion-exchange chromatography*) tiene aplicación tanto en el ámbito orgánico como inorgánico, siempre que los compuestos a separar se encuentren cargados positiva o negativamente. Puede ser aplicada en cationes o aniones mono, di o trivalentes, en aminas, ácidos grasos, etc.

Los empaquetamientos de las columnas están compuestos por un lecho formado por polímeros orgánicos, normalmente de resina formada por poliestireno con divinilbenceno entrecruzado. Este entrecruzamiento aporta una mayor resistencia a las fases estacionarias, pudiendo trabajar hasta a presiones de 4000 psi.

Las columnas de intercambio catiónico tienen grupos funcionalizados negativos adheridos a la resina, tales como $-\text{SO}_3^-$ o $-\text{COO}^-$. De forma análoga, las columnas cuyos polímeros contienen grupos positivos, por ejemplo amonios cuaternarios, son capaces de intercambiar aniones por lo que se denominan de intercambio aniónico.

La separación por IC no es tan sencilla como parece ya que ocurren de forma simultánea reacciones competitivas entre todas las especies cargadas en

disolución. Esto incluye a los ácidos y bases conjugadas de todos los compuestos de la muestra, a los grupos funcionales de la fase estacionaria así como cualquier tampón contenido en la fase móvil. Es por tanto crucial controlar el pH de las fase móviles para poder controlar la forma en que serán retenidos los analitos y la fuerza de elución de la fase móvil. A modo de ejemplo, la fuerza eluotrópica de una fase móvil que contenga “carbonatos” dependerá por completo de la forma en que estos se encuentren, ya que su poder de elución será mucho menor con una carga (HCO_3^-) que con dos (CO_3^{2-}).

1.3.3 Espectrometría de masas

Los espectrómetros de masas constituyen una herramienta analítica muy potente capaz de cuantificar compuestos conocidos con elevadas precisión, exactitud y sensibilidad, de identificar compuestos desconocidos de una muestra e incluso de proporcionar información que permita elucidar su estructura molecular. Su funcionamiento está basado en diferenciar a los átomos, moléculas o fragmentos de éstas en función de su relación masa-carga (m/z).

Las partes básicas de un espectrómetro de masas son el sistema de introducción de muestra, la fuente de iones unida mediante una interfase al analizador de masas y el detector. Tras su generación en la fuente, los iones en fase gaseosa son separados en función de su m/z en el analizador de masas para, finalmente, llegar al detector que generará una respuesta proporcional a la abundancia de cada m/z . Existen diversos tipos de analizadores de masas con características analíticas diferentes, incluyendo tiempo de vuelo (*time-of-flight*), sector magnético (*magnetic sector*), cuadrupolo (*quadrupole*), trampas de iones (*ion-trap*) y ciclotrón (*ion cyclotron resonance*) entre otros.

De entre todos los analizadores disponibles, el analizador de masas de tipo cuadrupolo es probablemente el más utilizado debido a su diseño compacto,

precio no muy elevado, tiempos de barrido bajos, versatilidad y fácil manejo²⁰. Tal y como indica su nombre, el filtro de masas cuadrupolar está formado por cuatro barras de sección cilíndrica o hiperbólica conductoras dispuestas de forma paralela unas de otras. Los pares de barras enfrentadas se encuentran unidas dos a dos mediante voltajes de corriente continua (DC) a la cual se superpone otro de radiofrecuencia (RF). Los voltajes aplicados entre los pares de barras unidas tienen distinta polaridad y la radiofrecuencia aplicada se encuentra desfasada 180° entre cada par de barras. Ajustando ambos voltajes de DC y de RF es posible obtener trayectorias estables resonantes para los iones de distintas relaciones m/z . De esta forma sólo aquellos iones que posean dicha relación m/z describirán la trayectoria adecuada para llegar al detector. Las principales restricciones de este analizador son su baja resolución (1 uma) y baja sensibilidad cuando se trabaja en modo de barrido de iones, por lo que la forma usual de trabajo está basada en la monitorización selectiva de iones (SIM, *Selected Ion Monitoring*).

Los analizadores de masas empleados en esta tesis han sido el analizador de iones cuadrupolar o cuadrupolo simple (Q) para la cuantificación de metales mediante IC-ICP-MS y el analizador de masas en triple cuadrupolo o en tándem (QqQ o MS/MS) para cuantificar compuestos orgánicos mediante LC-ESI-MS/MS. Por ello, a continuación, se describe brevemente su modo de operación y una serie de consideraciones a tener en cuenta para poder aplicar correctamente la dilución isotópica, puesto que este tipo de cuantificación es la que, mayoritariamente, se ha usado en esta tesis.

Cuadrupolo (Q) en ICP-MS

El analizador de tipo cuadrupolar simple ha sido ampliamente utilizado en compuestos orgánicos, tanto acoplado a cromatografía líquida como de gases. No obstante, esta sección se va a centrar en la configuración empleada en la presente investigación: el ICP-MS.

El filtro de masas cuadrupolar es el analizador más utilizado en ICP-MS hasta el día de hoy y desde su aparición en 1980. En los ICP-MS actuales el analizador cuadrupolar está precedido por una celda de colisión/reacción cuya función es minimizar la presencia de interferencias poliatómicas.

La realización de medidas exactas y precisas utilizando un ICP-MS no es un proceso inherente a la determinación analítica. En primer lugar, tal y como ya se ha comentado en este y anteriores apartados, deben eliminarse las interferencias espectrales (isobáricas o poliatómicas). Las isobáricas (por ejemplo ^{87}Rb en la medida de ^{87}Sr) son difíciles de eliminar. En general se suele recurrir a correcciones matemáticas, a su separación cromatográfica o a ajustes lineales múltiples. También pueden usarse instrumentos de alta resolución y la mencionada celda en modo reacción, que desplaza el isótopo de interés en el eje de masas por formación controlada de un compuesto con el gas de reacción.

Las interferencias poliatómicas pueden eliminarse, en función de su naturaleza, de cualquiera de las formas descritas para las isobáricas. Cabe comentar que la separación cromatográfica no es útil de manera universal, puesto que en ICP-MS, las interferencias poliatómicas se forman principalmente por combinación con los gases que entran junto con el Ar. No obstante, la forma más habitual de trabajo implica reducirlas al máximo mediante el uso de celdas de colisión/reacción aplicando un flujo de gas (helio o hidrógeno principalmente). El funcionamiento de estas celdas está basado en una reducción de los iones poliatómicos que llegan al detector originada por su colisión con los átomos de He o su reacción con H_2 . Esta colisión es más probable en los iones poliatómicos a causa de su mayor tamaño en comparación con los átomos individuales. No obstante, esta colisión también afecta al analito por lo que es necesario establecer un compromiso entre la disminución de señal de ambos.

Por otra parte, también es necesario tener en cuenta la discriminación de masas mediante el uso de expresiones matemáticas que proporcionen medidas de relaciones isotópicas corregidas. El efecto de discriminación de masas se describe en el apartado 1.3.4 que aborda la interfase en el ICP-MS y una descripción detallada del proceso de corrección se explica en el capítulo 2 dedicado a la determinación de especies de Cr.

El último efecto a tener en cuenta es el tiempo muerto del detector, o dicho en otras palabras, el tiempo necesario por la electrónica del detector para pasar de medir un ion a medir el siguiente. Se estima que la imprecisión asociada a la medida de relaciones isotópicas en un cuadrupolo, como desviación estándar relativa, RSD (%), se encuentra entre 0,1-0,5. En la instrumentación utilizada, el Agilent 7500c, el tiempo muerto se corrige de forma automática y viene fijado de fábrica.

Analizador de masas en tándem en LC-ESI-MS/MS

Los instrumentos de espectrometría en masas en tándem combinan dos analizadores separados mediante una celda de colisión. Las celdas de colisión pueden ser un cuadrupolo, un hexapolo o un octapolo dependiendo del fabricante. La función principal de la celda de colisión es la producción de fragmentos ionizados a partir del ion precursor seleccionado en el primer cuadrupolo. Paralelamente, se consigue mejorar la relación señal-ruido y se eliminan las interferencias espectrales que se solapan con el ion precursor siempre que no produzcan fragmentos con la misma m/z que los iones producto.

Cuando se trabaja en modo MS/MS se puede realizar un barrido de los iones producto obtenidos al fragmentar una determinada m/z (en el segundo cuadrupolo), un barrido de los iones precursores (en el primer cuadrupolo), búsqueda de pérdidas neutras, o monitorizar una transición seleccionada (SRM, *Selected Reaction Monitoring*). En esta tesis la cuantificación de los compuestos orgánicos se ha llevado a cabo en todos los casos mediante

espectrometría de masas en tándem utilizando un triple cuadrupolo (QqQ) en modo SRM. En esta nomenclatura, la q minúscula hace referencia a la celda de colisión donde las moléculas son fragmentadas.

La determinación mediante SRM empieza con la selección de un ion precursor, con una determinada m/z , en el primer cuadrupolo. Seguidamente este ion seleccionado pasa a la celda de colisión donde se induce su disociación en uno o diversos iones producto. Para ello los “iones moleculares” son acelerados por un potencial eléctrico que aumenta la energía de colisión hasta valores adecuados y en la cámara colisionan con el gas de colisión (en este caso argón). Los iones producto cargados pasan al segundo analizador en el cual se seleccionan una o diversas m/z objetivo para cada analito.

Comparada con la IDMS elemental, la IDMS orgánica con resolución unidad presenta un matiz añadido: ya no se adquieren relaciones masa-carga de isótopos de elementos si no de isotopómeros. Los isotopómeros son cada una de las distintas combinaciones de isótopos en una molécula que dan una misma masa molecular relativa. Por ejemplo, la fórmula molecular del isotopómero más abundante en el caso del fenol es C_6H_6O ($M=94$ uma). Para esta masa solo existe un isotopómero, pues todos los átomos están presentes en la forma del isótopo más ligero que, por otro lado, coincide con el más abundante de cada elemento. Sin embargo, para la masa $M+1$ existen tres combinaciones, tres isotopómeros, que serían adquiridos simultáneamente en el cuadrupolo: $^{13}C_1C_5H_6O$, $C_6^2H_1H_5O$ y $C_6H_6^{17}O_1$. Estas tres combinaciones podrían ser diferenciadas mediante analizadores de alta resolución pero no mediante cuadrupolos con resolución unidad. De forma análoga, los fragmentos seleccionados en el segundo cuadrupolo también son combinaciones de distintos isotopómeros. Estos hechos hacen que la aplicación de la dilución isotópica en su modalidad de cálculo mediante IPD orgánica sea más compleja.

Por otra parte, también es necesario estudiar las contribuciones de espectros contiguos parcialmente solapados (M-1, M+1, M+2, etc.) mediante el cálculo de las abundancias isotópicas teóricas. Este proceso se conoce como estudio de la pureza espectral. En QqQ estas contribuciones afectan a las medidas del segundo cuadrupolo y se asocian a las posibles ganancias y/o pérdidas parciales de hidrógeno originadas en la celda de colisión. Como ya se ha comentado anteriormente, no es necesario estudiar este fenómeno en el caso de utilizar a los trazadores isotópicos como patrones internos.

Finalmente, de la misma forma que ocurre en ICP-MS, también es necesario eliminar las interferencias espectrales isobáricas, que aún aparecen a pesar de la elevada selectividad del MS/MS. Las formas más comunes de enfrentarse a este problema es mediante la separación cromatográfica de la interferencia, cambiando el tratamiento de muestra para eliminarla o utilizando otra SRM.

Las consideraciones a tener en cuenta para llevar a cabo análisis por dilución isotópica con analizadores de triple cuadrupolo son las siguientes⁶:

- Existe la posibilidad de que se den efectos isotópicos en el porcentaje de fragmentación en compuestos deuterados
- La distorsión del perfil isotópico puede evitarse mediante la “apertura” del primer cuadrupolo para permitir la entrada de toda la distribución isotópica de los iones precursores. Esta distorsión consiste en la medida incorrecta del perfil isotópico del ion producto experimental, en comparación con el teórico calculado, si no se adquieren todos los iones precursores que contribuyen al ion producto seleccionado

Cabe destacar que esta última consideración puede ser solucionada mediante programas de cálculo matemático capaces de predecir las abundancias isotópicas medidas en el segundo cuadrupolo tales como *Isopatr*²⁴, que tengan en cuenta la selección de todos los isotopómeros en el primer cuadrupolo.

1.3.4 Acoplamiento LC-MS

El acoplamiento entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas (LC-MS) ofrece una de las técnicas analíticas más potentes de la actualidad. Sin embargo, el acoplamiento entre ambas técnicas ha sido mucho más complicado que su análogo GC-MS dado que la LC y la MS son, en un principio, técnicas incompatibles. Hasta el desarrollo de instrumentación adecuada a principios de los años 90, fueron muchos los problemas derivados de este acoplamiento, por lo que incluso llegó a etiquetarse por Arpino²⁵ como un “amor imposible”. Como se puede apreciar en la Figura 1.5, este autor representó a las moléculas de analito como un pez nadando en la fase móvil de la LC y a los iones moleculares en fase gaseosa del MS como un loro volando libremente.

El potencial inherente del acoplamiento “on-line” de la LC con MS fue la fuerza que promovió su desarrollo ya que permite la determinación de compuestos orgánicos que hasta el momento no se podían analizar mediante GC por no ser volátiles o térmicamente estables. De forma similar, el análisis elemental también se enfrentó con este problema ya que fue necesaria una fuente de ionización que eliminara la fase móvil y que a su vez fuera capaz de atomizar e

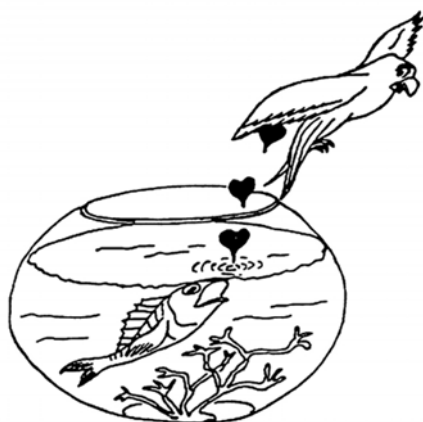


Figura 1.5 Representación de Arpino²⁵ de las dificultades asociadas al acoplamiento LC-MS.

ionizar a los analitos. Cabe comentar que el acoplamiento ICP-MS cuenta con décadas de experiencia y que el acoplamiento de un sistema LC a un ICP-MS es directo y relativamente sencillo. La salida de la columna se acopla al sistema de nebulización que conforma la introducción de muestra en el ICP-MS. Sin embargo, existe un problema adicional cuando se pretende llevar a cabo medidas de relaciones isotópicas: la diferente transmisibilidad de isótopos de masa diferente. Este problema se describe con mayor detenimiento en la siguiente subsección.

Acoplamiento LC-ICP-MS

La fuente de plasma de acoplamiento inductivo o ICP (*Inductively Coupled Plasma*) unida a la espectrometría de masas es la técnica más ampliamente utilizada para la medida de las relaciones isotópicas. ICP-MS se caracteriza por llevar a cabo estas medidas con gran precisión y exactitud. Permite además la determinación de la mayoría de metales y no metales a concentraciones a nivel de trazas. El primer acoplamiento ICP-MS fue descrito por Houk *et al.*²⁶ en el año 1980 y cambió por completo la forma de percibir el análisis elemental. Este tipo de acoplamiento ha sido el utilizado en el primer artículo incluido en esta tesis. Una de las principales características de esta fuente es que trabaja a temperaturas muy elevadas y, prácticamente, atomiza e ioniza toda la muestra (analitos y matriz). Así, esta fuente minimiza (cuando no elimina) problemas derivados del “Efecto Matriz” que sí que aparecen en otros tipos de fuentes como el electrospray, como se verá más adelante.

El proceso de ionización mediante ICP implica diversas etapas. En primer lugar, la muestra en forma líquida se transforma en un fino aerosol en el nebulizador. El sistema de nebulización facilita el acoplamiento entre LC e ICP-MS pues existen nebulizadores disponibles que operan a los diversos flujos cromatográficos que podemos encontrar. A continuación un flujo de argón portador conduce el aerosol hasta la parte central de la antorcha de plasma donde se alcanzan temperaturas de hasta 8000K. Es en este punto cuando el

aerosol que contiene la muestra se desolvata y los compuestos son sometidos a los procesos de vaporización, atomización e ionización. Finalmente los átomos ya ionizados son conducidos hasta el espectrómetro de masas mediante la interfase de extracción.

El paso de los iones desde el plasma (que se encuentra a presión atmosférica y alta temperatura) hasta el analizador de masas (que está a presiones del orden de 10^{-8} bar y a temperatura ambiente) no es inmediato. Por ello el diseño de la interfase de extracción fue el proceso más crítico durante el desarrollo comercial del ICP-MS. Tras la ionización los iones son extraídos desde un primer cono de níquel refrigerado por agua (o "sampler") a través de un orificio de 1 mm de diámetro forzados por una bomba de vacío rotatoria. Así pasan a una zona intermedia, antes de llegar a un segundo cono denominado "Skimmer", en el que la presión es aproximadamente de 1mbar. Esto origina una expansión adiabática que disminuye la temperatura del haz de iones. Tras pasar el orificio del "Skimmer" los iones se encuentran a una presión de cerca de 10^{-4} mbar gracias a una bomba turbomolecular.

Para poder realizar medidas isotópicas correctas debe tenerse en cuenta la forma de trabajo y el diseño de la interfase de extracción ya que la transmisión de dos isótopos de un mismo elemento no es la misma. Se han descrito dos procesos dependientes de la interfase: el efecto "espacio-carga" y el efecto "orificio"⁶ (Figura 1.6).

El efecto "espacio-carga" consiste en la repulsión mutua que sufren los iones del haz al abandonar el cono separador ("skimmer"). Por tanto, el número de iones que son transmitidos por la óptica iónica disminuye debido a que los iones más ligeros son desviados en un mayor grado mientras que los más pesados permanecen en el centro del haz iónico.

El efecto "orificio" también produce enriquecimiento en los iones más pesados. En la región situada en la interfase de extracción, se produce un chorro supersónico de iones, átomos y moléculas que se expande en función de su

energía cinética. Los iones más ligeros, con menor energía cinética, se expanden en mayor proporción que los pesados por lo que serán eliminados preferentemente por el sistema de vacío.

En ambos casos aumenta la llegada de isótopos de mayor masa al analizador de masas, ya que su trayectoria es más recta, en detrimento de los más ligeros. Este efecto físico se conoce como la discriminación de masas y origina una desviación de las relaciones isotópicas medidas, por lo que debe ser corregido¹⁷.

Acoplamiento LC-ESI-MS

Las mejoras aportadas en el análisis de moléculas orgánicas mediante la ionización por electrospray (ESI, *Electrospray Ionization*), sobre todo en el

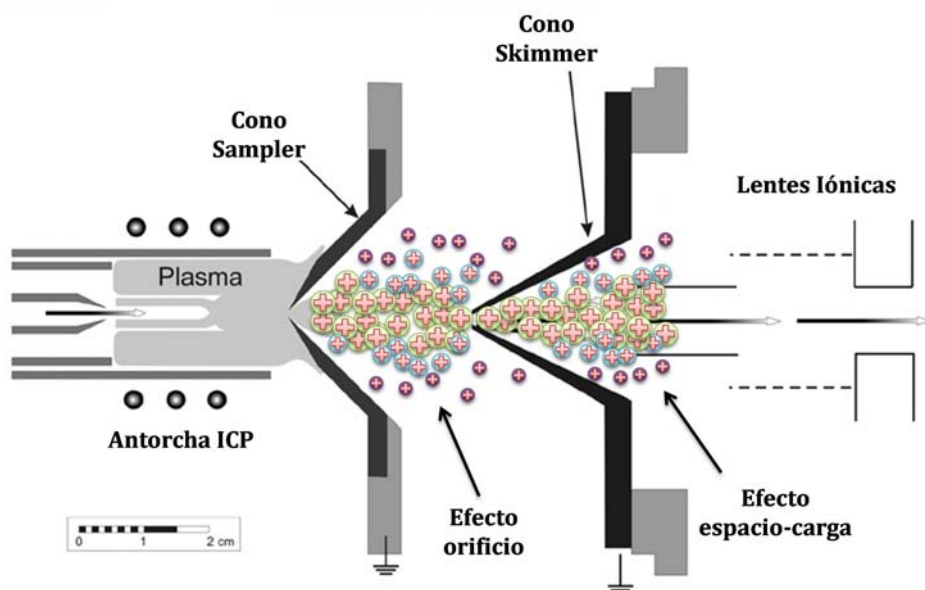


Figura 1.6 Interfase de extracción del ICP-MS, donde se observan las etapas que originan problemas de discriminación de masas.

campo del análisis de proteínas, fueron tan importantes que le valieron a John Bennett Fenn el premio Nobel en química del 2002. En esencia, en ESI las moléculas de interés contenidas en un líquido pasan a través de un tubo fino al que se aplica un alto voltaje electrostático, del orden de 3-4 kilovoltios. A continuación el líquido sale formando un fino aerosol de gotas cargadas a las que se les aplica un flujo de nitrógeno a contracorriente para evaporarlas. A medida que disminuye el tamaño de las gotas la repulsión colúmbica entre cargas dentro de las gotas aumenta hasta el punto en que estas son expulsadas en fase gas desde la superficie y se obtienen iones cargados libres que son conducidos hasta el detector de masas.

Como ocurre en el ICP, la fuente de iones se encuentra a presión atmosférica mientras que el detector de masas se encuentra en condiciones de alto vacío. Por ello también se emplea un sistema de vacío diferencial. Así, es posible que también se dé el efecto de la discriminación de masas, aunque éste es un tema que todavía no ha sido descrito⁶.

A diferencia del ICP la fuente electrospray es una técnica de ionización suave que permite medir la molécula protonada (en la forma de $M+H^+$) o desprotonada ($M-H^-$) sólo cambiando la polaridad del voltaje. La elección del modo positivo o negativo en el ESI dependerá de las características físico-químicas del analito seleccionado. Esta técnica ha sido empleada a lo largo de los artículos 2, 3, 4 y 5 como podrá consultarse más adelante.

La forma de ionización suave del electrospray presenta, por una parte, la gran ventaja de proporcionar información molecular y, por otra, un grave problema, su talón de aquiles²⁷: el efecto matriz.

El efecto matriz consiste en una alteración de la eficiencia de ionización causada por la co-elución de otros compuestos junto a los analitos. Teóricamente puede afectar en los dos sentidos, pudiendo producir tanto una exaltación como una disminución de la señal de los analitos. Sin embargo, en la gran mayoría de las situaciones está asociado a una supresión de la señal que

puede desembocar en la pérdida total de la misma. Diversos autores han demostrado que el efecto matriz es más acentuado en las fuentes que utilizan electrospray comparadas con cualquiera de las otras fuentes de ionización utilizadas en compuestos moleculares^{28,29}. La supresión de la señal en la fuente ESI puede ser debida a diferentes mecanismos. Entre ellos, la competición por el exceso de carga en la superficie de la microgotas del aerosol o la modificación de la viscosidad y tensión superficial que dificultan la llegada de los analitos a la superficie de la gota y su posterior evaporación³⁰.

Ante este problema, existen diversas soluciones para reducir el efecto matriz. La más sencilla es diluir el extracto de muestra para así reducir la cantidad de matriz que llega de forma simultánea a la fuente, pero la señal del propio analito también se verá reducida³¹. También se puede disminuir mediante la separación cromatográfica de los componentes de la matriz que lo producen, la extracción selectiva de los compuestos de interés o bien mediante un tratamiento de muestra más exhaustivo. El principal inconveniente de todas ellas es que aumenta de forma considerable el tiempo de desarrollo de los métodos^{30,32,33}.

Otras estrategias empleadas para compensar el efecto matriz están basadas en el uso de distintos tipos de calibrados, entre los que se incluyen la realización de curvas de calibrado preparadas en matriz, las adiciones estándar y el uso de trazadores enriquecidos isotópicamente. Un estudio exhaustivo de todas estas aproximaciones será tratado en el cuarto capítulo de esta tesis.

1.3.5 Validación de métodos

Proporcionar información analítica fiable es, sin duda, el propósito de la química analítica. La validación de la metodología analítica previamente a su aplicación es la etapa imprescindible para asegurar la fiabilidad de los resultados que ésta pueda proporcionar. Existen multitud de criterios que

deben cumplirse para la validación de métodos desarrollados en química analítica. Normalmente, para seleccionar la normativa vigente para la validación de métodos se debe tener en cuenta el tipo de analitos, la matriz, el territorio de aplicación de la metodología e incluso la concentración en la muestra.

La validación típica en las determinaciones elementales implica la aplicación de la metodología analítica desarrollada al análisis de materiales de referencia certificados (CRM, *Certified Reference Material*). En el análisis de compuestos orgánicos también se aplica este criterio pero dada la alta variabilidad tanto de compuestos como de matrices resulta prácticamente imposible encontrarlos. Por ello, la forma más usual de validar métodos de análisis de compuestos orgánicos es mediante la adición de una cantidad conocida de analitos a una muestra idealmente blanca, o en otras palabras, que no contenga a los analitos de interés. Esta metodología de trabajo se conoce como estudios de fortificación.

Los estudios de fortificación suelen incluir la comprobación del intervalo de linealidad de la curva de calibrado, la repetibilidad (en el mismo día) y la reproducibilidad (en días distintos) de los resultados, la exactitud a través de estudios de recuperación de la cantidad de analito añadida (los tres tipos de ensayo llevados a cabo a varios niveles de concentración) y el establecimiento del límite de cuantificación que se puede alcanzar. En oposición a los criterios típicos de validación IPD no requiere de estudios de linealidad ya que no precisa de curvas de calibrado. Aunque sí resulta necesario establecer la cantidad de trazador a añadir.

La confirmación de compuestos orgánicos está basada en la señal relativa que ofrecen dos de sus SRM cuando su patrón está preparado en disolvente. Siempre que no haya una legislación específica para los analitos estudiados, la validación general de métodos de análisis por laboratorios de referencia está supeditada a la Decisión 2002/657/EC de la Comisión Europea³⁴, en la que se

establecen las tolerancias máximas entre dos transiciones SRM del analito cuantificado en función de su intensidad relativa. Otro criterio queda recogido en la actual guía SANCO/12571/2013³⁵ que, a diferencia de la anterior, establece como límite una tolerancia máxima del 30% para todas las intensidades relativas.

Una forma de confirmación de compuestos orgánicos en IPD fue la aplicada por Castillo *et al.*³⁶ en la cual hizo uso de correcciones matemáticas para compensar la aportación del trazador isotópico a la transición de confirmación. Sin embargo, la mayoría de trabajos de IPD no incluyen esta forma de confirmación puesto que se utilizan diversas transiciones en la metodología de cuantificación³⁷.

Tabla 1.1 Tolerancias máximas aceptadas para las intensidades relativas mediante LC-MS/MS de acuerdo a la Decisión 2002/657/EC de la Comisión Europea³⁴.

Intensidad Relativa (% del pico base)	Tolerancia aceptada por LC-MS/MS
> 50 %	± 20 %
> 20 % al 50 %	± 25 %
> 10 % al 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

1.4 Bibliografía

1. *Programme budget 2012 – 2013*. (World Health Organization, 2011). at <http://whqlibdoc.who.int/pb/2012-2013/PB_2012-2013_eng.pdf?ua=1>
2. *Proposed programme budget 2014 – 2015*. (World Health Organization, 2013). at <http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA66/A66_7-en.pdf>
3. *Assuring food safety and quality: guidelines for strengthening national food control systems*. (FAO/WHO Publication, 2003). at <http://www.who.int/foodsafety/publications/capacity/en/Englih_Guidelines_Food_control.pdf?ua=1>
4. Sargent, M., Harte, R. & Harrington, C. *Guidelines for Achieving High Accuracy in Isotope Dilution Mass Spectrometry*. (The Royal Society of Chemistry, 2002).
5. Meija, J. & Mester, Z. Paradigms in isotope dilution mass spectrometry for elemental speciation analysis. *Anal. Chim. Acta* **607**, 115–125 (2008).
6. García Alonso, J. I. & Rodriguez-Gonzalez, P. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. (The Royal Society of Chemistry, 2013).
7. DeWitt, E. J., Lester, C. T. & Ropp, G. A. The Application of Isotope Dilution Technique in Studies of Reaction Rates and Equilibria: The Effect of Diene Structure on the Rate of the Diels-Alder Reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 2101–2103 (1956).
8. Hintelmann, H. & Evans, R. D. Application of stable isotopes in environmental tracer studies - Measurement of monomethylmercury

- (CH₃Hg⁺) by isotope dilution ICP-MS and detection of species transformation. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **358**, 378–385 (1997).
9. Osborn, B. L. & Abramson, F. P. Pharmacokinetic and metabolism studies using uniformly stable isotope labeled proteins with HPLC/CRIMS detection. *Biopharm. Drug Dispos.* **19**, 439–44 (1998).
 10. Wade, D. Deuterium isotope effects on noncovalent interactions between molecules. *Chem. Biol. Interact.* **117**, 191–217 (1999).
 11. Müller, S., Möder, M., Schrader, S. & Popp, P. Semi-automated hollow-fibre membrane extraction, a novel enrichment technique for the determination of biologically active compounds in water samples. *J. Chromatogr. A.* **985**, 99–106 (2003).
 12. González-Antuña, A. *et al.* Development of a routine method for the simultaneous confirmation and determination of clenbuterol in urine by minimal labeling isotope pattern deconvolution and GC-EI-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 1879–1888 (2012).
 13. Itoh, N., Numata, M., Aoyagi, Y. & Yarita, T. Comparison of the behavior of ¹³C- and deuterium-labeled polycyclic aromatic hydrocarbons in analyses by isotope dilution mass spectrometry in combination with pressurized liquid extraction. *J. Chromatogr. A* **1138**, 26–31 (2007).
 14. 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.* **19**, 401–407 (2005).
 15. Eeckhaut, A. Van, Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I. & Michotte, Y. Validation of bioanalytical LC – MS / MS assays : Evaluation of matrix effects. *J. Chromatogr. B.* **877**, 2198–2207 (2009).

16. 'Skip' Kingston, H. M., 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 At. Spectrosc.* **53**, 299–309 (1998).
17. 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 At. Spectrosc.* **60**, 151–207 (2005).
18. García Alonso, J. I. Determination of fission products and actinides by inductively coupled plasma-mass spectrometry using isotope dilution analysis : a study of random and systematic errors. *Anal. Chim. Acta* **312**, 57–78 (1995).
19. González-Antuña, A., Rodríguez-González, P. & García Alonso, J. I. Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **49**, 681–691 (2014).
20. Satinder Ahuja & Jespersen, N. *Comprehensive Analytical Chemistry (Book 47)*. (Elsevier Science, 2006).
21. Majors, R. E. Introduction: Recent Developments in Sample Preparation. *LCGC Eur.* 5 (2014). at <http://www.chromatographyonline.com/lcgc/Introduction-Recent-Developments-in-Sample-Prepara/ArticleStandard/Article/detail/843684>
22. Padrón, M. E. T., Afonso-Olivares, C., Sosa-Ferrera, Z. & Santana-Rodríguez, J. J. Microextraction techniques coupled to liquid chromatography with mass spectrometry for the determination of

- organic micropollutants in environmental water samples. *Molecules* **19**, 10320–10349 (2014).
23. Rubinson, K. A. & Rubinson, J. F. *Contemporary Instrumental Analysis*. (Prentice Hall Pres, 2000).
24. Ramaley, L. & Cubero Herrera, L. Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **22**, 2707–2714 (2008).
25. Arpino, P. J. On-line liquid chromatography/mass spectrometry? An odd couple! *Trends Anal. Chem.* **1**, 154–158 (1982).
26. Houk, R. S. *et al.* Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Anal. Chem.* **52**, 2283–2289 (1980).
27. Taylor, P. J. Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* **38**, 328–334 (2005).
28. Lien, G.-W., Chen, C.-Y. & Wang, G.-S. Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations. *J. Chromatogr. A* **1216**, 956–966 (2009).
29. Liang, H. R., Foltz, R. L., Meng, M. & Bennett, P. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **17**, 2815–2821 (2003).

30. Trufelli, H., Palma, P., Famiglini, G. & Cappiello, A. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* **30**, 491–509 (2011).
31. Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G. & Alder, L. Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: how much dilution is needed? *Anal. Chem.* **84**, 1474–1482 (2012).
32. Furey, A., Moriarty, M., Bane, V., Kinsella, B. & Lehane, M. Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta* **115**, 104–122 (2013).
33. Holčapek, M. *et al.* Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1217**, 3929–3937 (2010).
34. *European Union Decision 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.* (Official Journal of the European Communities).
35. Document No. SANCO/12571/2013; Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed 19.11.2013. (2014). at <http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2013_12571.pdf>
36. Castillo, Á. *et al.* Isotope pattern deconvolution-tandem mass spectrometry for the determination and confirmation of diclofenac in wastewaters. *Anal. Chim. Acta* **765**, 77–85 (2013).
37. González-Antuña, A. *et al.* Overcoming matrix effects in electrospray: Quantitation of β -agonists in complex matrices by isotope dilution liquid

chromatography-mass spectrometry using singly ^{13}C -labeled analogues.
J. Chromatogr. A. **1288**, 40–47 (2013).

Capítulo 2

Determinación de cromo en muestras sólidas medioambientales



2.1 Introducción

El cromo, con símbolo atómico Cr, es un elemento de características metálicas que fue descubierto en 1797 por el químico francés Nicolas-Louis Vauquelin. Ocupa el puesto veintiuno en el orden de elementos más abundantes en la corteza terrestre, encontrándose a un nivel de 102 mg/Kg. En la naturaleza no existe como cromo elemental y la forma más común de obtenerlo es a partir del mineral cromita (FeCr_2O_4). Su presencia en pequeñas proporciones aporta el color verde a la esmeralda y el rojo al rubí. Por ello, este elemento debe su nombre a la pronunciada variedad de colores que genera, derivando de la palabra griega *chrōmos*, cuyo significado es color. Con un número atómico de 24 y un peso atómico promedio de 51.996, presenta un total de cuatro isótopos estables (^{50}Cr , ^{52}Cr , ^{53}Cr y ^{54}Cr). Existen además cuatro posibles estados de oxidación para el cromo que van desde el +2 al +6, siendo los más comunes en el medio ambiente el Cr(III) y Cr(VI)¹.

Por una parte, el cromo trivalente (Cr(III)) es considerado un elemento traza esencial para los organismos vivos y es necesario para el metabolismo de grasas y carbohidratos, así como en el metabolismo de la glucosa. La falta de ingesta de cromo trivalente provoca el aumento del nivel de azúcar en sangre, de los niveles de triglicéridos y del colesterol, aumentando por tanto el riesgo de sufrir diabetes y afecciones cardiacas². En cambio se sabe que los compuestos de cromo hexavalente (Cr(VI)) son agentes tóxicos y carcinogénicos para una gran variedad de organismos. Las especies de Cr(VI) se absorben a través de los pulmones, el tracto digestivo, las membranas mucosas y la piel. Estas características tan dispares se deben a que la toxicidad,

movilidad y biodisponibilidad del cromo depende en gran medida de su forma química. La mayoría de los compuestos de Cr(VI) son muy solubles, móviles y biodisponibles en comparación con las especies de Cr(III). Dado que las propiedades físico-químicas de cada una de estas especies son tan dispares, es imprescindible cuantificarlas de forma individual. En química analítica la caracterización y determinación de las especies de un elemento en una muestra se conoce como análisis de especiación. En la determinación de metales, este tipo de cuantificación es de vital importancia ya que el impacto de un elemento sólo puede ser dilucidado cuando todas las formas químicas en las que pueda encontrarse son identificadas y determinadas individualmente.

Las características propias del cromo hacen que sea ampliamente utilizado en la elaboración de aleaciones, compuestos químicos y de productos refractarios. En la actualidad, entre el 60-70% del cromo producido se utiliza en aleaciones, principalmente en forma de acero inoxidable, y un 15% se utiliza en procesos químicos industriales, incluyendo tintes para pieles, pigmentos, catalizadores y cromados. En la actualidad, su elevada demanda a nivel mundial encabezada por la potencia emergente China, ha derivado en un continuo aumento de la producción desde principios de los años noventa. Este hecho queda recogido en la última encuesta del Servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS, *United States Geological Survey*) según la cual la producción mundial en 2013 alcanzó las $2.6 \cdot 10^7$ toneladas³. Aproximadamente la mitad de la producción mundial de cromita se extrae de Sudáfrica, aunque también se obtiene en grandes cantidades en Kazajistán e India, y en menor escala en Estados Unidos y Europa. En concreto, destaca el caso de Estados Unidos donde el cromo es uno de los metales más críticos e importantes estratégicamente en el ámbito económico. Por ejemplo, en 2013 este país utilizó alrededor del 6% de la producción mundial de cromita para la producción de compuestos químicos y de cromo metálico, pero sobre todo para la producción de acero inoxidable.

La gran utilización del cromo a escala mundial ha provocado que éste se haya convertido en un serio contaminante del aire, del suelo y del agua. Volviendo al

caso de Estados Unidos, su producción masiva ha originado que cientos de lugares de este país estén expuestos a contaminación por Cr (VI). Por ello, la EPA (*Environmental Protection Agency*), la organización encargada de la protección del medio ambiente en EEUU estableció, en el año 1991 como medida de seguridad, un nivel máximo de cromo total en aguas potables de 0.1 mg/L. Dicho límite incluía la suma de todas las especies de Cr(III) y Cr(VI). No obstante, esta medida no es suficiente ya que una concentración de 0.1 mg/L del oligoelemento Cr(III) no implicaría un riesgo para la salud pero sí lo sería el mismo nivel de Cr(VI). A pesar de las características carcinogénicas del cromo hexavalente, no fue hasta abril de 2014 cuando se estableció, por vez primera en EEUU, una regulación específica para este compuesto en aguas potables en el estado de California, reduciéndose el nivel máximo permitido a sólo 0.01 mg/L⁴. En el caso de la normativa vigente en España, los niveles máximos recomendados son aún más restrictivos, estableciéndose un máximo de 0.005 mg/L para el Cr(VI) en aguas superficiales⁵.

Aunque la legislación vigente gira en torno a los niveles de cromo disuelto en aguas, la principal fuente de contaminación se encuentra en los suelos cercanos a vertidos industriales. El cromo contenido en estos vertidos pasa, mediante lixiviación al suelo, pudiendo finalmente alcanzar las aguas subterráneas. Por este motivo, es necesaria la monitorización de los niveles de cromo en suelos para así poder controlar el problema desde la raíz. De acuerdo con la legislación vigente de la EPA, el límite permisible de cromo hexavalente en suelos debe ser obtenido mediante el Procedimiento de Lixiviación para Caracterizar la Toxicidad⁶ (TCLP, *Toxicity Characteristic Leaching Procedure*), que simula las condiciones de lixiviación de contaminantes que ocurriría en un vertedero. De forma breve, este análisis consiste en una extracción con una solución tamponada de ácido acético en una proporción 1:20 con la muestra, durante 18 horas. En el caso del cromo la concentración obtenida mediante TCLP debe ser inferior a 5 µg/L para cumplir con la legislación norteamericana. Sin embargo, tal y como señalan Unceta et al.⁷, todavía no

existe una legislación que establezca unos límites concretos para la concentración de cromo en muestras sólidas.

Metodologías de análisis

La determinación de las cantidades relativas de Cr(VI) y Cr(III) presentes inicialmente en una muestra resulta un proceso sumamente complicado. Debido a procesos de oxidación-reducción, las dos formas de cromo pueden interconvertirse durante el tratamiento de muestra. Como ya se ha comentado, dado que las características del Cr(III) y del Cr(VI) son tan dispares, no es suficiente especificar la concentración total de cromo que se encuentra en la muestra, sino que deben conocerse sus concentraciones de forma individual. En una muestra líquida o extracto las interconversiones entre estas dos especies dependen del potencial redox(Eh) y del pH del medio (Figura 2.1), que se ven afectados a su vez por la presencia de agentes oxidantes y reductores en la matriz de la muestra. En disolución, el Cr(III) es estable a valores de Eh y pH bajos. En cambio, a valores elevados de Eh y pH está favorecida la especie de Cr(VI) mientras que el Cr(III) precipita como hidróxido. Por otra parte, es necesario tener en cuenta durante el análisis el envejecimiento de los hidróxidos de Cr(III), ya que los hidróxidos recientemente formados tienen mayor tendencia a oxidarse pudiendo originar resultados incorrectos⁸. Además las interconversiones entre ambas especies son muy frecuentes también durante las etapas de almacenamiento y/o durante el proceso de medida.

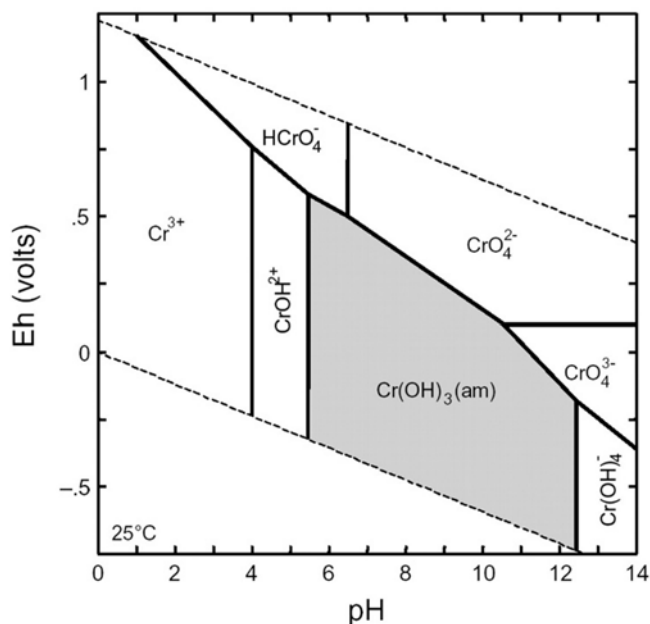


Figura 2.1 Diagrama de estabilidad Eh-pH para el cromo. Adaptado de Ball y colaboradores⁸.

Cuando nos enfrentamos al análisis de muestras sólidas la determinación de las distintas especies es todavía más compleja. Suelen encontrarse tanto agentes reductores del Cr(VI) como oxidantes de Cr(III), que se extraen junto a estas especies de cromo. Así estos pueden interactuar en la fase líquida con el cromo extraído, originando interconversiones incontroladas en los procesos de tratamiento de muestra. Entre los reductores más comunes en suelos y sedimentos se encuentran un gran número de especies que contienen Fe(II), sulfitos, ácidos húmicos y diversos compuestos orgánicos, y entre los oxidantes de Cr(III) peróxido de hidrógeno, oxígeno disuelto y óxidos de manganeso⁹. La correcta especiación en muestras sólidas se va a tratar en el primer artículo incluido en esta tesis, el artículo científico 1, como se podrá ver más adelante.

El tratamiento de muestras sólidas habitual para la determinación de cromo exige una extracción previa que solubilice todas sus formas presentes en la muestra. También existen otras técnicas recientes, como por ejemplo la ablación láser acoplada a la espectrometría de masas de resonancia de ion ciclotrón con Transformada de Fourier (LA-FTICRMS), que permite el análisis directo en muestras sólidas evitando la etapa de extracción. Mediante este análisis la especiación es posible ya que los clústeres de iones son distintos en función de la especie de cromo, lo que permite una diferenciación entre óxidos de cromo trivalente y hexavalente. Sin embargo, en la actualidad, el ámbito de aplicación de esta estrategia queda reducido a muestras puras o en mezclas simples de las distintas especies y aún resulta complicada su cuantificación⁷. El procedimiento de extracción de las formas de Cr(VI) más utilizado es el método EPA 3060A. Consiste en una digestión en medio básico (0,28 mol/L Na_2CO_3 + 0,5 mol/L NaOH) a 90-95°C durante 60 minutos. En el extracto las formas características de las distintas especies son habitualmente el hidróxido de cromo ($\text{Cr}(\text{OH})_4^-$) para el cromo trivalente y el anión cromato (CrO_4^{2-}) para el hexavalente. En teoría, este método es capaz de extraer todas las formas de Cr(VI) ya sean solubles, adsorbidas o precipitadas, además de minimizar la interconversión entre especies.

Tras la extracción de las formas de cromo, la forma clásica de determinar la cantidad total de éste en los extractos líquidos es mediante espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) o mediante espectrometría de absorción atómica (AAS). No obstante, cuando se necesita conocer de forma detallada la cantidad de cada una de las especies, es imprescindible una separación previa del Cr(III) y Cr(VI). Para poder cuantificar de forma específica al cromo hexavalente, la EPA propone las siguientes metodologías:

- Método 7195. Este método está basado en la separación del Cr(VI) de la disolución mediante su coprecipitación como cromato de plomo con

sulfato de plomo en una solución de ácido acético. Tras su reducción a Cr(III) se determina mediante AAS.

- Método 7196A. Método colorimétrico en el que se hace reaccionar el cromo hexavalente con difenilcarbazida en medio ácido para formar un complejo coloreado, que absorbe a 540 nm.
- Método 7197. Se forma un quelato de cromo hexavalente con pirrolidinditiocarbamato amónico, que tras extraerlo se detecta mediante AAS.
- Método 7198. Método polarográfico en el que se mide el pico de corriente producido por la reducción de Cr(VI) a Cr(III) en un electrodo de gotas de mercurio durante una rampa de pulsos diferenciales
- Método 7199. Método basado en la separación de las especies por la cromatografía iónica en medio básico tamponado, seguido de una medida colorimétrica similar al 7196A por derivatización post-columna con difenilcarbazida.

El problema latente en todas las metodologías descritas anteriormente es que ninguna de ellas es capaz de corregir las interconversiones que puedan ocurrir durante los procesos de extracción y medida de las muestras. Este inconveniente fue resuelto en 1998 en el grupo de Kingston mediante la aplicación de espectrometría de masas de dilución isotópica específica en cuanto a la especie (SSIDMS)^{10,11}. Este método, basado en la medida de relaciones isotópicas, se caracterizaba por su capacidad de corregir las reacciones de interconversión entre especies de un mismo elemento mediante la adición de compuestos marcados isotópicamente para cada una de las especies. A su vez, las investigaciones llevadas a cabo fueron recogidas bajo la patente US 5414259 A¹², bajo el título genérico “Metodología para la especiación mediante espectrometría de masas de dilución isotópica”. Finalmente, diez años más tarde esta metodología fue adoptada por la EPA en su método 6800¹³ “Espectrometría de masas de dilución isotópica elemental y por especies”.

En este capítulo se muestra el desarrollo de un método para suelos y sedimentos basado en extracción por microondas que mejora las características del método EPA 3060A. Con este procedimiento se minimizan las interconversiones entre Cr(III) y Cr(VI) y se corrigen las que se puedan dar mediante el uso de trazadores marcados isotópicamente. Para ello se ha hecho uso de las ecuaciones IPD (que emplean abundancias isotópicas, ver sección 1.2.3) junto a balances de masa adicionales, con el propósito de obtener las concentraciones originales de Cr(III) y Cr(VI) en la muestra. Cabe comentar que la minimización de la oxidación de Cr(III) a Cr(VI) es suficientemente efectiva como para evitar el uso del segundo trazador isotópico. Con ello se simplifican las etapas de cálculo y se reduce el coste de aplicar esta metodología. El procedimiento se explica detalladamente en la siguiente sección.

2.2 Método rápido y exacto para la determinación de Cr(VI) en muestras sólidas basado en espectrometría de masas de dilución isotópica

En la primera contribución científica de esta tesis se incluye la optimización y validación de un nuevo método para la determinación de cromo hexavalente en muestras sólidas mediante ICP-MS. Para ello, la separación y posterior cuantificación de las especies de cromo Cr(III) y Cr(VI) se basó en el acoplamiento de la cromatografía líquida de intercambio aniónico a un detector de masas con un cuadrupolo, utilizando como fuente de iones el plasma de acoplamiento inductivo.

De forma general, las principales mejoras alcanzadas en este método fueron su alta fiabilidad y reducción del tiempo total de análisis, características básicas en todo método de rutina.

Una de las etapas de este trabajo que requirió mayor esfuerzo fue la optimización de la extracción de las especies de cromo mediante la aplicación de microondas focalizadas (MAE), hecho que permitió reducir el tiempo de extracción cuantitativa de 1 hora (de acuerdo con el método estándar de la EPA 3060A) a 10 minutos. Además, mediante la adición de agentes complejantes en la fase extractante, en concreto EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), se estabilizaron las especies de cromo trivalente, hecho que facilitó su extracción y posterior cuantificación. La Figura 2.2 muestra el esquema de funcionamiento del sistema de microondas focalizadas utilizado. Este dispositivo se caracteriza por su capacidad de focalizar la radiación de microondas hacia el recipiente que contiene la muestra sólida y el extractante. Dadas sus características técnicas fue posible controlar factores tales como la temperatura (incluida la realización de rampas, mediante el sensor por infrarrojos), la presión y la velocidad de agitación.

Durante el proceso de optimización de las condiciones de extracción, se observó que la aplicación de dos ciclos de extracción a distintas temperaturas (5 minutos a 90°C seguidos de 5 minutos a 110°C) permitía una extracción cuantitativa del cromo hexavalente. A su vez, estas condiciones ofrecieron valores despreciables de oxidación de Cr(III) a Cr(VI) y valores muy bajos de reducción del Cr(VI) a Cr(III). La optimización de esta etapa de extracción se llevó a cabo utilizando materiales de referencia certificados (CRM). Al tratarse de muestras sólidas los ensayos de fortificación son menos adecuados para asegurar la exactitud del método, puesto que los analitos añadidos sobre la muestra no quedan unidos de la misma forma que los endógenos.

Es importante señalar que la derivatización de la especie de cromo trivalente Cr(III) con EDTA, para formar la especie negativa $[\text{Cr}(\text{EDTA})]^-$, permitió su separación de la de cromo hexavalente presente en forma de CrO_4^{2-} mediante cromatografía líquida de intercambio aniónico. El correspondiente cromatograma se puede consultar en el artículo científico 1, incluido en este capítulo.

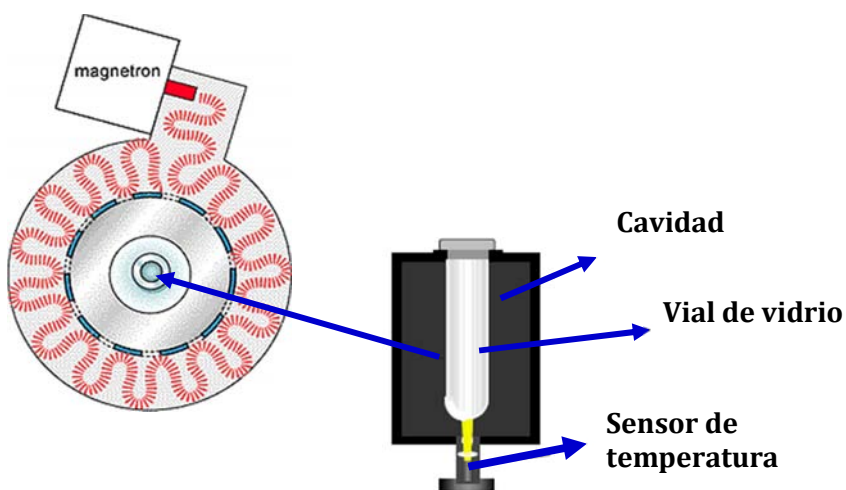


Figura 2.2 Esquema del sistema de microondas focalizadas.

La reducción del tiempo de análisis no se limitó sólo al tratamiento de muestra sino que también se disminuyó haciendo uso de la metodología de cálculo de deconvolución de perfiles isotópicos (IPD) que, como ya se ha comentado en la introducción, evita el uso de curva de calibrado. En el caso del cromo fue necesario estudiar y corregir las posibles interconversiones entre las especies durante los procesos de tratamiento de muestra y medida. Para ello se utilizaron dos trazadores isotópicos distintos: el $^{53}\text{Cr}(\text{III})$ y el $^{50}\text{Cr}(\text{VI})$. A través de la monitorización de estos, y estableciendo balances de masa adicionales a los habituales a IPD, fue posible corregir los procesos de oxidación del $\text{Cr}(\text{III})$ con el $^{53}\text{Cr}(\text{III})$ mientras que la reducción del $\text{Cr}(\text{VI})$ se corrigió haciendo uso del trazador $^{50}\text{Cr}(\text{VI})$. En los siguientes apartados se van a desglosar tanto las ecuaciones para el cálculo de la concentración de cada una de las especies de cromo, como las que se aplicaron para corregir la discriminación de masas. Por último, se describen las principales interferencias espectrales del cromo en el detector de ICP-MS y las medidas tomadas para su eliminación.

Desarrollo de las ecuaciones de IPD y factores de interconversión

Tal y como se ha comentado en apartados anteriores, cuando existen procesos de transformación entre las distintas especies de un elemento las ecuaciones tradicionales de IPD no son suficientes. Dado que el compuesto natural y el trazador isotópico presentan un comportamiento idéntico, los posibles procesos de transformación que afectan a una sola especie no influyen en el resultado del cálculo mediante IPD. Sin embargo, cuando existen procesos de interconversión entre diferentes especies químicas, el resultado del cálculo no coincide con la composición real si no se conoce la extensión de cada uno de los procesos de conversión. Por ello, a continuación se van a describir todos los balances de masas utilizados para realizar las cuantificaciones en las muestras utilizadas en el método desarrollado.

En primer lugar, se establecieron los balances molares para cada una de las especies en la mezcla una vez se han producido las posibles interconversiones y se ha alcanzado el equilibrio entre especies:

$$N_m^{Cr(III)} = N_{nat}^{Cr(III)} + N_{t1,Cr(VI)}^{Cr(III)} + N_{t2,Cr(III)}^{Cr(III)} \quad (1)$$

$$N_m^{Cr(VI)} = N_{nat}^{Cr(VI)} + N_{t1,Cr(VI)}^{Cr(VI)} + N_{t2,Cr(III)}^{Cr(VI)} \quad (2)$$

Dónde:

- $N_m^{Cr(III)}$ moles de Cr(III) en la mezcla
- $N_{nat}^{Cr(III)}$ moles de Cr(III) en la muestra
- $N_{t1,Cr(VI)}^{Cr(III)}$ moles de Cr(III) reducidos a partir del trazador 1 de $^{50}\text{Cr(VI)}$
- $N_{t2,Cr(III)}^{Cr(III)}$ moles de Cr(III) en el trazador 2 de $^{53}\text{Cr(III)}$
- $N_m^{Cr(VI)}$ moles de Cr(VI) en la mezcla
- $N_{nat}^{Cr(VI)}$ moles de Cr(VI) en la muestra
- $N_{t1,Cr(VI)}^{Cr(VI)}$ moles de Cr(VI) en el trazador 1 de $^{50}\text{Cr(VI)}$
- $N_{t2,Cr(III)}^{Cr(VI)}$ moles de Cr(VI) oxidados a partir del trazador 2 de $^{53}\text{Cr(III)}$

Como se mostró en el capítulo anterior, se pueden establecer estos balances molares para cada uno de los isótopos de un elemento haciendo uso de las abundancias isotópicas. Asimismo, dividiendo cada uno de estos balances de masas por el número total de moles, se obtienen las expresiones en función de las fracciones molares. Si se reagrupan estas expresiones en forma matricial, la expresión obtenida para calcular las fracciones molares de Cr(III) en la muestra, así como del trazador 1 y del trazador 2, es la siguiente:

$$\begin{bmatrix} A_{m,Cr(III)}^{50} \\ A_{m,Cr(III)}^{52} \\ A_{m,Cr(III)}^{53} \\ A_{m,Cr(III)}^{54} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{50} & A_{t1,Cr(VI)}^{50} & A_{t2,Cr(III)}^{50} \\ A_{nat}^{52} & A_{t1,Cr(VI)}^{52} & A_{t2,Cr(III)}^{52} \\ A_{nat}^{53} & A_{t1,Cr(VI)}^{53} & A_{t2,Cr(III)}^{53} \\ A_{nat}^{54} & A_{t1,Cr(VI)}^{54} & A_{t2,Cr(III)}^{54} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{nat}^{Cr(III)} \\ X_{t1,Cr(VI)}^{Cr(III)} \\ X_{t2,Cr(III)}^{Cr(III)} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{50} \\ e^{52} \\ e^{53} \\ e^{54} \end{bmatrix} \quad (3)$$

De la misma forma, la matriz de cálculo aplicada al cromo hexavalente, Cr(VI) es:

$$\begin{bmatrix} A_{m,Cr(VI)}^{50} \\ A_{m,Cr(VI)}^{52} \\ A_{m,Cr(VI)}^{53} \\ A_{m,Cr(VI)}^{54} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{50} & A_{t1,Cr(VI)}^{50} & A_{t2,Cr(III)}^{50} \\ A_{nat}^{52} & A_{t1,Cr(VI)}^{52} & A_{t2,Cr(III)}^{52} \\ A_{nat}^{53} & A_{t1,Cr(VI)}^{53} & A_{t2,Cr(III)}^{53} \\ A_{nat}^{54} & A_{t1,Cr(VI)}^{54} & A_{t2,Cr(III)}^{54} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{nat}^{Cr(VI)} \\ X_{t1,Cr(VI)}^{Cr(VI)} \\ X_{t2,Cr(III)}^{Cr(VI)} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{50} \\ e^{52} \\ e^{53} \\ e^{54} \end{bmatrix} \quad (4)$$

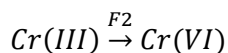
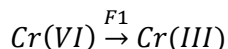
Cabe recordar que $A_{m,Cr(III)}^i$ y $A_{m,Cr(VI)}^i$ son las abundancias experimentales para cada isótopo medidas en el pico de Cr(III) y Cr(VI), respectivamente, después del proceso de mezcla, mientras que A_{nat}^i , A_{t1}^i y A_{t2}^i son las abundancias de los compuestos puros (natural o marcado). Éstas, se pueden obtener de los valores teóricos tabulados y de los correspondientes certificados. La resolución del sistema de ecuaciones proporciona las fracciones molares de cada perfil isotópico en los picos de Cr(III) y Cr(VI).

Una vez obtenidos los valores de las fracciones molares, la cantidad total de Cr(III) y Cr(VI) en la mezcla, $N_m^{Cr(III)}$ y $N_m^{Cr(VI)}$, se puede calcular con las expresiones (5) y (6), utilizando las cantidades iniciales de trazadores $N_{t1,Cr(VI)}$ (de $^{50}\text{Cr(VI)}$) y $N_{t2,Cr(III)}$.

$$N_{t1,Cr(VI)} = X_{t1,Cr(VI)}^{Cr(VI)} \cdot N_m^{Cr(VI)} + X_{t1,Cr(VI)}^{Cr(III)} \cdot N_m^{Cr(III)} \quad (5)$$

$$N_{t2,Cr(III)} = X_{t2,Cr(III)}^{Cr(VI)} \cdot N_m^{Cr(VI)} + X_{t2,Cr(III)}^{Cr(III)} \cdot N_m^{Cr(III)} \quad (6)$$

Si se definen los factores de conversión, $F1$ como la cantidad relativa de Cr(VI) transformada en Cr(III) y $F2$ como la cantidad de Cr(III) transformada en Cr(VI), se pueden calcular de la siguiente manera:



$$F1 = \frac{X_{t1,Cr(VI)}^{Cr(III)} \cdot N_m^{Cr(III)}}{N_{t1,Cr(VI)}} \quad (7)$$

$$F2 = \frac{X_{t2,Cr(III)}^{Cr(VI)} \cdot N_m^{Cr(VI)}}{N_{t2,Cr(III)}} \quad (8)$$

Finalmente, se pueden obtener las concentraciones corregidas para la muestra aplicando los factores de conversión, a partir de la resolución del siguiente sistema de ecuaciones:

$$X_{nat}^{Cr(III)} \cdot N_m^{Cr(III)} = N_{muestra}^{Cr(III)} (1 - F2) + F1 \cdot N_{muestra}^{Cr(VI)} \quad (9)$$

$$X_{nat}^{Cr(VI)} \cdot N_m^{Cr(VI)} = N_{muestra}^{Cr(VI)} (1 - F1) + F2 \cdot N_{muestra}^{Cr(III)} \quad (10)$$

Corrección de la discriminación de masas

Ya se ha comentado en la introducción que la discriminación de masas, provocada por los efectos “orificio” y “espacio-carga” en la interfase, conlleva una transmisión más eficiente de los iones más pesados respecto a los de menor masa. Si este efecto no se corrige las relaciones isotópicas o las abundancias isotópicas medidas experimentalmente en un ICP-MS estarán sesgadas favorablemente hacia los isótopos más pesados. El error sistemático cometido es proporcional a la diferencia de masa entre dos isótopos cualesquiera de un elemento dado. Para la corrección de la discriminación de masas se han propuesto diversas funciones. Todas se basan en la comparación

entre las relaciones isotópicas teóricas de un elemento y las medidas experimentalmente. En este trabajo se ha asumido una dependencia lineal del efecto de discriminación de masas con la diferencia de masa de los isotopos en los que se mide la relación.

$$K = \frac{R_{\text{experimental}} - R_{\text{teórica}}}{R_{\text{teórica}} \cdot \Delta M} \quad (11)$$

Siendo:

- $R_{\text{teórica}} = \frac{\text{Abundancia teórica } ^a\text{Cr}}{\text{Abundancia teórica } ^b\text{Cr}}$ (tabulada)
- $R_{\text{experimental}} = \frac{\text{Abundancia experimental } ^a\text{Cr}}{\text{Abundancia experimental } ^b\text{Cr}}$
- ΔM , diferencia de masa entre los isótopos a y b

El isótopo *b* se toma como referencia y se calculan las relaciones isotópicas del resto de isótopos respecto a éste, tanto para las abundancias teóricas (tabuladas o certificadas) como para las medidas experimentalmente. Posteriormente, la representación del factor $(R_e - R_t)/R_t$ frente a ΔM proporciona una recta cuya pendiente coincide con el valor de *K*. Las abundancias experimentales se calculan como $A^i = \frac{I^i}{\sum I^i}$, siendo *I* el área de pico de Cr(III) y Cr(VI) en el cromatograma para cada isótopo.

La constante de discriminación de masas *K* se obtiene para un patrón que se inyecta cada tres muestras. Para estas tres muestras se usa la media de los dos valores de *K* obtenidos de los patrones que las engloban y se calculan las relaciones isotópicas (ecuación 12) y las abundancias corregidas (ecuación 13)

$$R_{\text{corregida}} = \frac{R_{\text{experimental}}}{1 + K\Delta M} \quad (12)$$

$$A_{spike}^i = \frac{R_{corregida}^i}{\sum R_{corregida}^i} \quad (13)$$

Interferencias espectrales

La determinación de cromo mediante ICP-MS aplicando Dilución Isotópica no es sencilla debido tanto a las interferencias isobáricas producidas por el ^{54}Fe como a las interferencias poliatómicas de diferentes isótopos producidas por carbono, oxígeno, cloro y argón. Todas estas posibles interferencias se han recogido en la tabla siguiente.

Respecto a las interferencias poliatómicas que afectan a la determinación del cromo, las principales son $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ y $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^1\text{H}^+$. El uso de un ICP-MS con celda de colisión/reacción y el empleo de He como gas de colisión las reduce de forma suficiente. Para ello se seleccionó un flujo de He de 1.2 mL/min. En cuanto a las interferencias isobáricas debidas al ^{54}Fe , estas se evitan mediante el uso de un sistema cromatográfico con conexiones de PEEK (*Polyether ether ketone*) y componentes que no tienen acero a diferencia de los sistemas tradicionales

Tabla 2.1 Composición isotópica del cromo natural y principales interferencias espectrales

Isótopo	^{50}Cr	^{52}Cr	^{53}Cr	^{54}Cr
Abundancia (%)^a	4,3452(85)	83,7895(117)	9,5006(110)	2,3647(48)
Interferencias isobáricas	-	-	-	^{54}Fe
Interferencias poliatómicas	$^{38}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$	$^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^1\text{H}^+$
	$^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$	$^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$
		$^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^1\text{H}^+$	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$

^a valores IUPAC con incertidumbres expandidas.

2.2.1 Artículo científico 1

Fast and Accurate Procedure for the Determination of Cr(VI) in Solid Samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry

Fabregat-Cabello, N., Rodríguez-González, P., Castillo, Á., Malherbe, J.; Roig-Navarro, A. F., Long, S. E. & García Alonso, J. I. G. *Environmental Science and Technology* 2012, 46, 12542–12549

ENVIRONMENTAL
Science & Technology

Article
pubs.acs.org/est

Fast and Accurate Procedure for the Determination of Cr(VI) in Solid Samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry

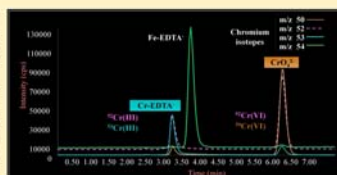
Neus Fabregat-Cabello,[†] Pablo Rodríguez-González,[†] Ángel Castillo,[‡] Julien Malherbe,[§] Antoni F. Roig-Navarro,[‡] Stephen E. Long,[§] and J. Ignacio García Alonso^{*,†}

[†]Faculty of Chemistry, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

[‡]Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, 12071, Castellón, Spain

[§]Analytical Chemistry Division, Material Measurement Laboratory, National Institute of Standards and Technology, 100 Bureau Drive, Stop 8391, Gaithersburg, Maryland, 20899, United States

ABSTRACT: We present here a new environmental measurement method for the rapid extraction and accurate quantification of Cr(VI) in solid samples. The quantitative extraction of Cr(VI) is achieved in 10 minutes by means of focused microwave assisted extraction using 50 mmol/L Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at pH 10 as extractant. In addition, it enables the separation of Cr species by anion exchange chromatography using a mobile phase which is a 1:10 dilution of the extracting solution. Thus, neutralization or acidification steps which are prone to cause interconversion of Cr species are not needed. Another benefit of using EDTA is that it allows to measure Cr(III)-EDTA complex and Cr(VI) simultaneously in an alkaline extraction solution. The application of a 10 minutes focused microwave assisted extraction (5 min at 90 °C plus 5 min at 110 °C) has been shown to quantitatively extract all forms of hexavalent chromium from the standard reference materials (SRM) candidate NIST 2700 and NIST 2701. A double spike isotope dilution mass spectrometry (IDMS) procedure was employed to study chromium interconversion reactions. It was observed that the formation of a Cr(III)-EDTA complex avoided Cr(III) oxidation for these two reference materials. Thus, the use of a double spiking strategy for quantification is not required and a single spike IDMS procedure using isotopically enriched Cr(VI) provided accurate results.



■ INTRODUCTION

Chromium is widely used in industrial applications as a pigment, for electroplating, leather tanning, and as a catalyst. These uses lead to continuous Cr emissions into the environment where it is mainly found as Cr(III) and Cr(VI). The hexavalent forms of chromium (mainly as CrO_4^{2-}) are highly soluble, toxic, and carcinogenic. Instead, trivalent chromium is less toxic and has been considered a micronutrient. Nevertheless recent studies have demonstrated that Cr(III) can originate eczema and DNA damage in cell-culture systems.¹ Nowadays, the analytical focus is on the selective determination of chromium(VI) either in solid matrices (soils, dust, welding fumes) or waters. The determination of chromium(VI) in solid matrices is complicated because quantitative extraction of chromium(VI) must be assured while avoiding chromium redox interconversion reactions to Cr(III) either during extraction or the subsequent chemical analysis.²

The determination of chromium(VI) is normally carried out by ICP-MS after the chromatographic separation of Cr(III) and Cr(VI). The redox equilibrium between Cr(III) and Cr(VI) is highly affected either by differences in pH or by the addition and/or presence of reducing or oxidizing agents. Therefore,

special attention has to be paid to such interconversion reactions in every step of the sample treatment. The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) proposed in 1992 a colorimetric method (7196A) for the determination of Cr(VI) in ground waters based on its specific reaction with diphenylcarbazide to form a colored complex. EPA Method 7199 also employs this reaction after a previous separation of Cr(VI) and Cr(III) by ion chromatography.³ In 1996, the U.S. EPA promoted method 3060A to extract Cr(VI) from soluble, adsorbed, and precipitated forms of Cr(VI) in soils, sludge, sediments, and similar waste materials.⁴ This method employs strong basic conditions using $\text{NaOH-Na}_2\text{CO}_3$ as extracting solution for 1 h at 90 °C. None of these methods are capable of correcting for the oxidation of Cr(III) and/or reduction of Cr(VI) which strongly depends on the nature of the sample. So, improvement of the extraction procedure or an adequate correction of the interconversion reactions is required to provide accurate Cr(VI) concentrations in solid samples.

Received: June 7, 2012
Revised: September 14, 2012
Accepted: October 23, 2012
Published: October 23, 2012

Reproduced with permission from: *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46 (22), pp 12542–12549.
Copyright © 2012 American Chemical Society <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es3022864>

Fast and Accurate Procedure for the Determination of Cr(VI) in Solid Samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry

Environmental Science and Technology, 46 (2012) 12542–12549.

Neus Fabregat-Cabello,^a Pablo Rodríguez-Gonzalez,^a Angel Castillo,^b Julien Malherbe,^c Antoni F. Roig-Navarro,^b Stephen E. Long,^c and J. Ignacio García Alonso^{*,a}

^aFaculty of Chemistry, Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julian Clavería 8, 33006 Oviedo, Spain

^bResearch Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, 12071, Castellon, Spain

^cAnalytical Chemistry Division, Material Measurement Laboratory, National Institute of Standards and Technology, 100 Bureau Drive, Stop 8391, Gaithersburg, Maryland, 20899, United States

ABSTRACT

We present here a new environmental measurement method for the rapid extraction and accurate quantification of Cr(VI) in solid samples. The quantitative extraction of Cr(VI) is achieved in 10 minutes by means of focused microwave assisted extraction using 50 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) at pH 10 as extractant. In addition, it enables the separation of Cr species by anion exchange chromatography using a mobile phase which is a 1:10 dilution of the extracting solution. Thus, neutralization or acidification steps which are prone to cause interconversion of Cr species are not needed. Another benefit of using EDTA is that it allows to measure Cr(III)-EDTA complex and Cr(VI) simultaneously in an alkaline extraction solution. The application of a 10 minutes focused microwave assisted extraction (5 min at 90 °C plus 5 min at 110 °C) has been shown to quantitatively extract all forms of hexavalent chromium from the standard reference materials (SRM) candidate NIST 2700 and NIST 2701. A double spike isotope dilution mass spectrometry (IDMS) procedure was employed to study chromium interconversion

reactions. It was observed that the formation of a Cr(III)-EDTA complex avoided Cr(III) oxidation for these two reference materials. Thus, the use of a double spiking strategy for quantification is not required and a single spike IDMS procedure using isotopically enriched Cr(VI) provided accurate results.

KEYWORDS. Chromium (VI), isotope dilution mass spectrometry, microwave assisted extraction.

1. INTRODUCTION

Chromium is widely used in industrial applications as a pigment, for electroplating, leather tanning, and as a catalyst. These uses lead to continuous Cr emissions into the environment where it is mainly found as Cr(III) and Cr(VI). The hexavalent forms of chromium (mainly as CrO_4^{2-}) are highly soluble, toxic, and carcinogenic. Instead, trivalent chromium is less toxic and has been considered a micronutrient. Nevertheless recent studies have demonstrated that Cr(III) can originate eczema and DNA damage in cell-culture systems [1]. Nowadays, the analytical focus is on the selective determination of chromium(VI) either in solid matrices (soils, dust, welding fumes) or waters. The determination of chromium(VI) in solid matrices is complicated because quantitative extraction of chromium(VI) must be assured while avoiding chromium redox interconversion reactions to Cr(III) either during extraction or the subsequent chemical analysis [2].

The determination of chromium(VI) is normally carried out by ICP-MS after the chromatographic separation of Cr(III) and Cr(VI). The redox equilibrium between Cr(III) and Cr(VI) is highly affected either by differences in pH or by the addition and/or presence of reducing or oxidizing agents. Therefore, especial attention has to be paid to such interconversion reactions in every step of the sample treatment. The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) proposed in 1992 a colorimetric method (7196A) for the determination of

Cr(VI) in ground waters based on its specific reaction with diphenylcarbazide to form a colored complex. EPA Method 7199 also employs this reaction after a previous separation of Cr(VI) and Cr(III) by ion chromatography [3]. In 1996, the U.S. EPA promoted method 3060A to extract Cr(VI) from soluble, adsorbed, and precipitated forms of Cr(VI) in soils, sludge, sediments, and similar waste materials [4]. This method employs strong basic conditions using NaOH-Na₂CO₃ as extracting solution for 1 h at 90 °C. None of these methods are capable of correcting for the oxidation of Cr(III) and/or reduction of Cr(VI) which strongly depends on the nature of the sample. So, improvement of the extraction procedure or an adequate correction of the interconversion reactions is required to provide accurate Cr(VI) concentrations in solid samples.

Isotope dilution mass spectrometry (IDMS) is regarded as a primary measurement method directly traceable to the International System of Units [5]. The application of IDMS for the determination of Cr(VI) was first reported by Nusko and Heumann [6] in 1994 with the analysis of waste waters by thermal ionization mass spectrometry (TIMS). These authors employed a double spike of Cr(III) and Cr(VI) both enriched in ⁵³Cr. However, this procedure was not able to correct for oxidation/reduction reactions of Cr(III) and Cr(VI). The first method capable of correcting for Cr(III)–Cr(VI) interconversion (both oxidation and reduction reactions simultaneously) was published by Kingston and co-workers using double spike IDMS in waters [7] and contaminated soils [8–10]. This strategy, denominated “Speciated IDMS” by the authors, was later adopted by the U.S. EPA as method 6800 for the determination of Cr(VI) in environmental samples [11]. The method requires the addition to the sample, before extraction, of known amounts of isotopically enriched Cr(III) and Cr(VI), each one enriched in a different isotope. However, those methods [9–11] (including method EPA 6800 for Cr(VI) determination in soils) make use of a particular strategy when performing double spike IDMS. They are based on the addition to the sample of a highly enriched ⁵³Cr(VI) spike and an excess of a less expensive lowly

enriched $^{50}\text{Cr}(\text{III})$ spike before extraction [9–11]. This strategy is based on two assumptions: (i) the enriched $\text{Cr}(\text{III})$ spike is easier to oxidize than endogenous $\text{Cr}(\text{III})$ and (ii) the total amount of $\text{Cr}(\text{III})$ that can be oxidized is limited regardless of the sample matrix and the extraction conditions applied [9].

The development of analytical procedures for the extraction of $\text{Cr}(\text{VI})$ from solid samples requires reliable reference materials. However, although there are several available certified reference materials (CRM) of hexavalent chromium in solid matrices, there is still little consensus on a reference extraction methodology [12]. For example, during the certification process of the $\text{Cr}(\text{VI})$ content in the Standard Reference Material NIST 2701 (contaminated soil), methods 7196A, 7199, and 6800 were compared [13]. However, the results obtained using methods 7196A and 7199 were up to 40% lower than those obtained by Method 6800. In all cases, method 3060A was employed for the extraction of $\text{Cr}(\text{VI})$. Recently, the analysis of the same SRM 2701 by X-ray absorption near edge structure spectroscopy (XANES) in the solid phase yielded $\text{Cr}(\text{VI})$ mass fraction values 6 times higher than the certified value, [14] which is based on an EPA Method 3060A extraction. Another example is the certification process of BCR-454 (welding dust loaded on a filter) in which an alkaline extraction procedure similar to method 3060A was selected by most participating laboratories. The final certified value, 40.16 ± 0.60 mg/g of $\text{Cr}(\text{VI})$, was lower than the total chromium value determined by instrumental neutron activation analysis (INAA) [15] which was 49.6 ± 2.8 mg/g. A final example corresponds to the certified reference material CRM 041 which is a sandy clay soil certified for $\text{Cr}(\text{VI})$ at 86.4 mg/kg. The reference value was determined by using U.S. EPA method 3060A extraction and final determination by methods 7195, 7196A, and 7199 in a round-robin exercise in which 21 laboratories participated.

Double spiking IDMS would be required for the optimization and selection of the best extraction conditions for $\text{Cr}(\text{VI})$ from solid matrices. However,

when performing Cr speciation analysis by double spike IDMS in solid samples, it is not possible to prepare an isotopic spike matching all the Cr(III) chemical forms occurring in the sample [9]. For this purpose the addition of complexing agents during Cr(VI) extraction has been evaluated. Agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), [16] diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) [17] or ethylenediamine-*N,N'*-disuccinic acid (EDDS) [18] have been reported to improve the extraction efficiency of Cr(VI) and the stabilization of the extracted Cr compounds. The use of EDTA as the extracting solution has several advantages over other published extraction procedures: first, it complexes trivalent chromium preventing its oxidation to Cr(VI) throughout the analytical procedure and second it facilitates the extraction of Cr(VI) from the solid sample by complexation of other metals forming insoluble chromates [16]. This was demonstrated for insoluble chromates such as PbCrO_4 , BaCrO_4 , SrCrO_4 diluted with SiO_2 when performing an extraction procedure based on an alkaline (pH 8.5 or 9.5) ultrasonic assisted extraction at 40 °C for 10 or 30 min [16–18].

We employ here double spike IDMS to evaluate a focused microwave assisted extraction using EDTA as extractant for the determination of Cr(VI) in solid samples. The aim of this strategy is to complex and stabilize not only the added enriched Cr(III) spike but also the endogenous Cr(III) leached during the extraction procedure. As a consequence, there is no need for the addition of large amounts of isotopically labeled Cr(III) to prevent the oxidation of endogenous Cr(III) as reported previously [9–11]. The extraction procedure proposed here is carried out at 50 mmol/L EDTA at pH 10 and accelerated to 10 minutes by applying a focused microwave assisted extraction. Several reference materials are analyzed to test the proposed methodology.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Instrumentation

Chromatographic separation of Cr(III) and Cr(VI) was performed with a Dionex DX-120 HPLC System (Sunnyvale, CA) and a Dionex Ion pack AS9-HC anion-exchange column (PEEK, 4 × 250 mm × 9 μm). The detection of chromium was carried out by ICP-MS using an Agilent 7500c quadrupole instrument (Agilent Technologies, Tokyo, Japan) equipped with an octapole collision cell, using helium as collision gas. A focused microwave system Explorer Hybrid (CEM, Mathews, NC) equipped with temperature and pressure feedback control and magnetic stirring was employed for the microwave extraction of Cr(VI) from the solid matrices.

2.2 Reagents and Materials

All solutions were prepared in 18 MΩ cm ultrapure deionized water. The extractant and mobile phase employed were aqueous solutions at pH 10 containing 50 and 5 mmol/L EDTA, respectively. They were prepared by dissolving ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma, St. Louis, MO) in water and adjusting the pH with NH₄OH (30%) (Merck, Darmstadt, Germany). Enriched ⁵⁰Cr(VI) and ⁵³Cr(III) solutions were provided by ISC-Science (Oviedo, Spain). The mass fractions of the isotopically enriched ⁵⁰Cr(VI) in the stock solution were quantified periodically by reverse isotope dilution analysis against a natural abundance Cr(VI) standard solution prepared from a potassium dichromate reference material purchased from BAM (Federal Institute for Materials Research and Testing, Berlin, Germany). The natural abundance solution of Cr(VI) was prepared by dissolving approximately 60 mg of K₂Cr₂O₇ in 60 mL of a NaOH solution at pH 12. The mass fraction of the isotopically enriched ⁵³Cr(III) was quantified by reverse isotope dilution analysis using a Cr(III) natural abundance standard obtained from Fluka (Buchs, Switzerland). No impurity of ⁵³Cr(VI) was detected in the ⁵³Cr(III) spike solution, or ⁵⁰Cr(III) in the ⁵⁰Cr(VI) solution. The measured mass

fraction of ^{53}Cr -enriched Cr(III) was $847 \pm 7 \mu\text{g/g}$ (1s). A stability study of the ^{50}Cr (VI) solution was performed over a period of four months. Table 1 shows the isotopic composition and mass fraction obtained by reverse IDMS of both ^{50}Cr (VI) and ^{53}Cr (III) enriched spike solutions. A stability study of the ^{53}Cr (III) solution was not carried out because the extent of Cr(III) oxidation was found to be systematically negligible during the course of the experiments. As can be observed in Table 1, no significant variations in the ^{50}Cr (VI) mass fraction values were obtained with an average value of $164.9 \pm 3.9 \mu\text{g/g}$ (1s) and a RSD of 2.4% over the studied period.

Several reference materials were analyzed in this work: SRM 2701 (soil containing chromite ore processing residue) purchased from NIST (National Institute of Standards and Technology, U.S.), CRM BCR-545 (Welding dust loaded on a filter) purchased from IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium) and CRM041 (Sandy clay soil) purchased from Resource Technology Corporation (Laramie, WY). A candidate Standard Reference Material SRM 2700 (Hexavalent chromium in contaminated soil, low level) was also provided by NIST and was also analyzed in this work. SRM 2700 is a 1:40 dilution of the SRM 2701 with ground high-purity quartz and is still under certification process.

2.3 Procedures

Previous to sample preparation, all solid samples were homogenized by mechanical shaking during 15 min at 30 rpm (3.14 rad/s). Typically, a sample weight of ca. 100 mg (or 50 mg if the expected mass fraction of the sample was higher than $500 \mu\text{g/g}$) was weighted in a 10 mL microwave test tube. EDTA is a good buffer itself at pH 10 because of the pKa of EDTA is 10.24 so the extracting solution was prepared dissolving the EDTA in water and then adjusted to pH 10. Then, a volume of 5 mL of the extracting solution (50 mmol/L EDTA aqueous solution at pH 10) was added and weighed amounts of the isotopically labeled ^{53}Cr (III) and ^{50}Cr (VI) were added according to the

Table 1. Isotopic composition (% abundance) of the enriched ⁵⁰Cr(VI) and enriched ⁵³Cr(III) spike solutions employed in this work^a.

Isotope	⁵⁰Cr(VI) (At %)	⁵³Cr(III) (At %)
50	95.17 ± 0.19	0.25 ± 0.03
52	4.77 ± 0.18	7.73 ± 0.23
53	0.06 ± 0.01	91.59 ± 0.28
54	Not detected	0.43 ± 0.09
Date of Reverse IDMS	⁵⁰Cr(VI) (µg/g)	⁵³Cr(III) (µg/g)
November 2011	169.2 ± 0.6	847 ± 7
December 2011	167.8 ± 1.5	
January 2012	165.8 ± 0.6	
February 2012	160.4 ± 1.5	
March 2012	161.4 ± 1.5	
Average	164.9 ± 3.9	847 ± 7

^aThe uncertainty in the isotopic composition is expressed as 1s standard deviation of n = 6 independent replicates whereas the uncertainty of the mass fraction values is expressed as 1s standard deviation of n = 3 independent replicates.

random error propagation theory [19]. For routine analysis purposes, the addition of the Cr(VI) spike should be done at the decision level required for the legislation. Then a ratio of concentrations between analyte and spike in the range of 0.1 to 10 will provide accurate and precise results. The amounts of sample and isotopically enriched solutions were accurately weighted in an analytical balance with a precision of 0.00001 g. A stir bar was introduced into the microwave system and placed in the autosampler of the focused microwave unit. Then, a microwave assisted extraction based on two cycles (five minutes at 90 °C plus five minutes at 110 °C) with constant stirring was applied. A power limit of 200 W and a ramp time of 1 min was set in the instrument to gradually achieve the extraction temperature. The samples were allowed to cool to room temperature before applying the second extraction cycle at higher temperature. After that, the sample was centrifuged at 5000 rpm (524 rad/s) for 5 min and an aliquot of the supernatant, usually

1 mL, was diluted 10 times with ultrapure deionized water for its injection in the chromatographic system. The use of a 1:10 dilution of the extracting solution as mobile phase avoided the need for neutralization or acidification of the sample. Also the centrifugation step avoided the need of sample filtering allowing a quicker sample preparation and a lower risk of contamination and/or interconversion of the Cr species.

2.4 Quantification by Double Spike Isotope Dilution Mass Spectrometry

The calculation of the interconversion-corrected mass fraction of Cr(III) and Cr(VI) in the samples was carried out by double spike IDMS using the mathematical approach based on isotope pattern deconvolution described previously [20–22]. Briefly, molar balances are established as a function of the different isotopic compositions of the endogenous and enriched species. The mathematical system of equations obtained from those amount balances is solved by multiple linear regression in which a least-squares fitting is applied to calculate molar fractions from species-specific isotopic abundances. For this purpose all four Cr isotopes are monitored and employed for the quantification of the isotope abundances of the chromatographic peaks. Using this approach it is possible to calculate the mass fractions of Cr(III) and Cr(VI) in the original samples and the percentage of spike Cr(VI) reduced to Cr(III) (reduction factor F1) and the percentage of spike Cr(III) oxidized to Cr(VI) (oxidation factor F2).

2.5 Quantification by Single Spike Isotope Dilution Mass Spectrometry

In all cases the hexavalent chromium mass fraction was also calculated by single spike IDMS using only the data obtained for the Cr(VI) peak in the chromatogram. If there is Cr(III) oxidation during or after extraction this methodology would provide analytical results different from those of double spike IDMS. However, if there is only Cr(VI) reduction the single spike IDMS

mathematical treatment would provide the same Cr(VI) concentrations than those obtained by double spike IDMS.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Optimization of Chromatographic Conditions

From all the above-mentioned stabilizing agents, EDTA was employed in this work instead of the DTPA [17] or EDDS [18] based on the better chromatographic separation obtained. EDTA provided narrower peaks and lower separation time with a satisfactory chromatographic resolution. As the measurement of isotope ratios is more precise when working with narrower peaks, EDTA was selected for further experiments. The separation of Cr(III) (as $\text{Cr}(\text{EDTA})^-$) and Cr(VI) (as CrO_4^{2-}) was carried out by ion-exchange chromatography (IC) at a flow rate of 1.0 mL/min using 5 mmol/L EDTA at pH 10 as mobile phase. This mobile phase was selected because it provided good peak profiles and adequate separation of Cr(III) and Cr(VI) in less than 7 min. Besides, it is a 10-fold dilution of the extracting solution so there is no need for sample acidification after extraction because pH 10 is employed in both solutions. As a consequence, possible sample loss of Cr(VI) during neutralization is avoided [8]. For example, using EPA Method 7196A the sample extracts after EPA 3060A extraction must be acidified to $\text{pH } 2 \pm 0.5$ before the colorimetric determination. Also the methodology proposed by Rahman et al. [9,10] when employed in the combination of methods EPA 3060A and EPA 6800 [11] requires the acidification of the extracts to pH 4–5 before analysis which may promote the oxidation of Cr(III) to Cr(VI). Another advantage of the proposed methodology is that the mobile phase also helps to keep Cr(III) in solution and to stabilize it by the formation of the Cr(III)–EDTA complex. Thus, it is possible to simultaneously measure Cr(III)–EDTA complex and Cr(VI) in an alkaline extraction solution. Figure 1 shows an IC-ICPMS chromatogram of a NIST 2701 extract (diluted 1:10) under the selected experimental conditions. As can be observed, there is a complete

separation of Cr(III) and Cr(VI) in less than 7 min. The peak width at the base for both Cr(III) and Cr(VI) peaks is ca. 30 s without any remarkable tailing. The large peak observed at mass 54 in Figure 1 corresponds to the Fe-EDTA complex which elutes between Cr(III) and Cr(VI). This iron peak was always observed when analyzing real soil samples indicating that the EDTA extraction procedure was able to solubilize iron, even only partially. The presence of $^{53}\text{Cr}(\text{III})$ and $^{50}\text{Cr}(\text{VI})$ in the samples can also be seen from the relative isotopic peak profiles in Figure 1. The ICP-MS measurement of chromium isotopes suffer from different polyatomic interferences: $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, and $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$.

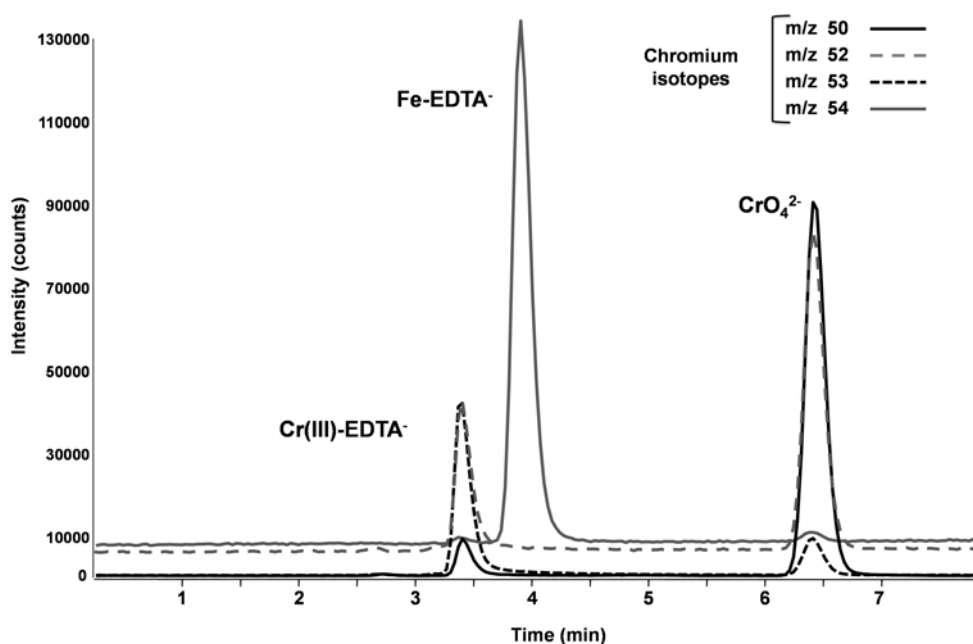


Figure 1. IC-ICP-MS chromatogram of an extract of SRM 2701 soil CRM using 5 mmol/L EDTA at pH 10 as mobile phase.

Such polyatomic interferences were minimized using a He gas flow of 2 mL/min in the octapole collision cell which reduced the baseline at masses 52 and 54 in the chromatogram. The peak areas for all measured masses both for Cr(III) and Cr(VI) were employed for the final quantification by IDMS.

3.2 Optimization of the Focused Microwave-Assisted Extraction

Studies on Isotope Equilibration and Interconversion Reactions. The development of an extraction procedure based on IDMS requires first, a quantitative extraction of the analyte species and second, a complete isotope equilibration in the liquid phase between the endogenous and isotopically added enriched species before any species interconversion takes place. In this paper we have selected microwave assisted extraction in order to obtain much faster extraction kinetics and isotope equilibration. However, the application of a rapid extraction procedure could jeopardize the achievement of isotope equilibration before the complete extraction of the analyte species [23]. To evaluate the attainment of isotopic equilibration with a rapid extraction procedure we tested different strategies using focused microwaves. First, we applied an extraction time fixed at 5 min changing the extraction temperature using SRM 2701 as test sample. As can be observed in Figure 2a, the reduction of Cr(VI) to Cr(III) started to be observed at 100 °C (5.3%). This value increased to 24.7% at 110 °C and to 67.9% at 120 °C. At temperatures of 130 and 140 °C no Cr(VI) peak was detected indicating complete reduction of Cr(VI) during extraction. Figure 2a also shows the oxidation factor for Cr(III) to Cr(VI), which was negligible under all tested conditions, demonstrating that no oxidation of Cr(III) was detected.

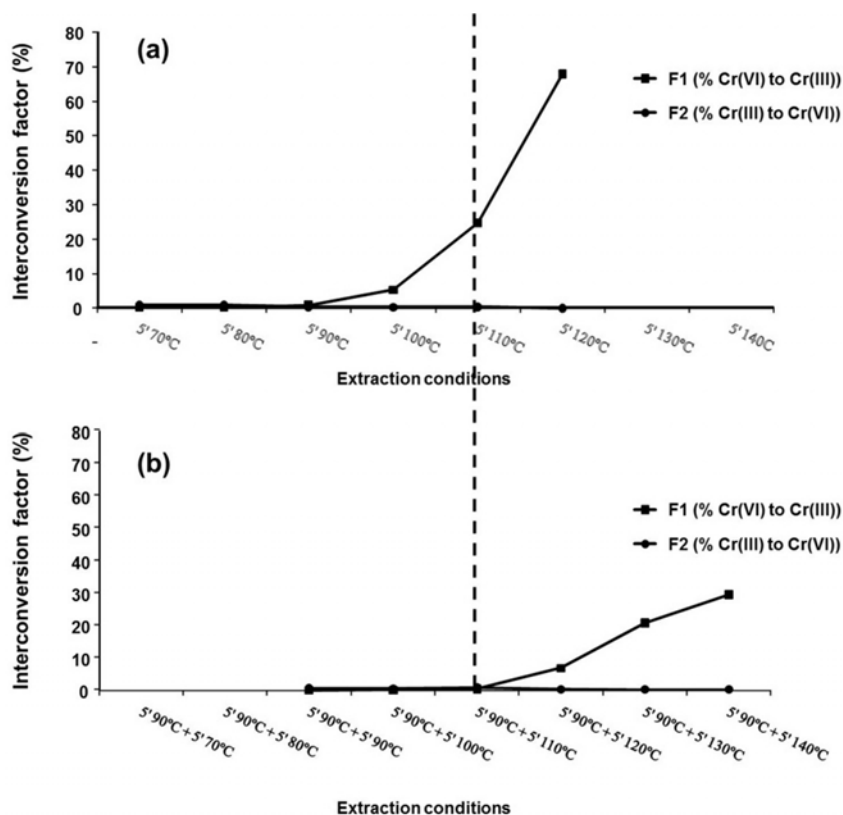


Figure 2. Values of the reduction factor F1 (% Cr(VI) to Cr(III)) and the oxidation factor F2 (% Cr(III) to Cr(VI)) when (a) one-cycle extraction and (b) two-cycle extraction is applied during the analysis of the high contaminated soil SRM 2701. Vertical dashed line represents the borderline between the absence and occurrence of degradation using a two-cycle extraction.

The recoveries for Cr(VI) at 70 or 90 °C (where no chromium interconversion was detected) using 5 min extraction were not quantitative (ca. 80–90% recovery from the certified value). So, a second experiment keeping the extraction temperature constant at 70 °C and changing the extraction time from 2 to 20 min was carried out. Under all tested conditions (data not shown) no interconversion reactions were detected but no real

improvement in the recovery for Cr(VI) was accomplished. So, we decided to perform a third experiment in which the extraction was carried out in two steps and at two different temperatures. According to Figure 2a the first step was carried out at 90 °C, a temperature low enough that no interconversion reactions were detected but significant Cr(VI) was extracted allowing isotope equilibration to take place. Then, increasing temperatures were applied in a second step of 5 min extraction.

The results obtained for the interconversion reactions are shown in Figure 2b. As can be observed, Cr(VI) reduction is now negligible at 110 °C, lower than 10% at 120 °C and below 30% at 140 °C. Figure 2b also shows that negligible oxidation of ⁵³Cr(III) was obtained under all conditions as demonstrated with the values of the degradation factor F2 (always lower than 1%). This demonstrates a satisfactory stability of the Cr(III)–EDTA complex under all extraction conditions tested. According to these results, a previous pre-extraction cycle of 5 min at 90 °C prevents the occurrence of Cr species interconversion and facilitates isotope equilibration between enriched and endogenous Cr species in the liquid phase.

Recoveries of Cr(VI) during the Analysis of Reference Materials. Multiple spiking IDMS is one of the most powerful analytical tools to study the extraction efficiency of a given sample preparation protocol. To do so, the sample under investigation must contain the analyte species endogenously bound to the solid matrix [5]. The multiple spiking theory [23] establishes that if a sequence of increasingly harder (or longer) extraction conditions is applied to the same sample, the real concentration values of the analyte species can be estimated from the plateau of the plot of degradation-corrected analyte concentration vs extraction conditions. In this study, a wide range of different extraction conditions applying focused microwaves was tested in three different materials (SRM 2701, candidate SRM 2700 and CRM-041) containing hexavalent chromium.

Figure 3 shows the Cr(VI) mass fractions and interconversion factors obtained in SRM 2701, candidate SRM 2700 and CRM-041, respectively, when the time and temperature of the second extraction cycle are increased (maintaining a pre-extraction cycle at 90 °C during 5 min in agreement with the previous section). In all cases, the Cr(VI) mass fractions were calculated both by double and single spike IDMS for comparison purposes.

Overall, Figure 3 demonstrates that, for all reference materials tested, the complexation of Cr(III) with EDTA avoids the oxidation of $^{53}\text{Cr(III)}$ under all extraction conditions employed, even when almost quantitative reduction of $^{50}\text{Cr(VI)}$ was obtained. This is also reflected in the fact that the concentration results obtained by double spike IDMS and conventional single spike IDMS are not statistically different. Thus, using the proposed procedure complicated mathematical treatment required for double spiking IDMS is not needed and the application of the single spike procedure for routine analysis is facilitated. Korolczuyk and Grabarczyk [16] demonstrated experimentally, that the addition of EDTA to the extracting solution minimizes the speed of Cr(III) oxidation to Cr(VI). The demonstration that Cr(III)–EDTA complex is the real stabilizing factor in this work, would require comparison experiments in the absence of EDTA. However, under our experimental conditions the absence of EDTA does not allow the simultaneous measurement of Cr(III) and Cr(VI) and double IDMS could not be applied.

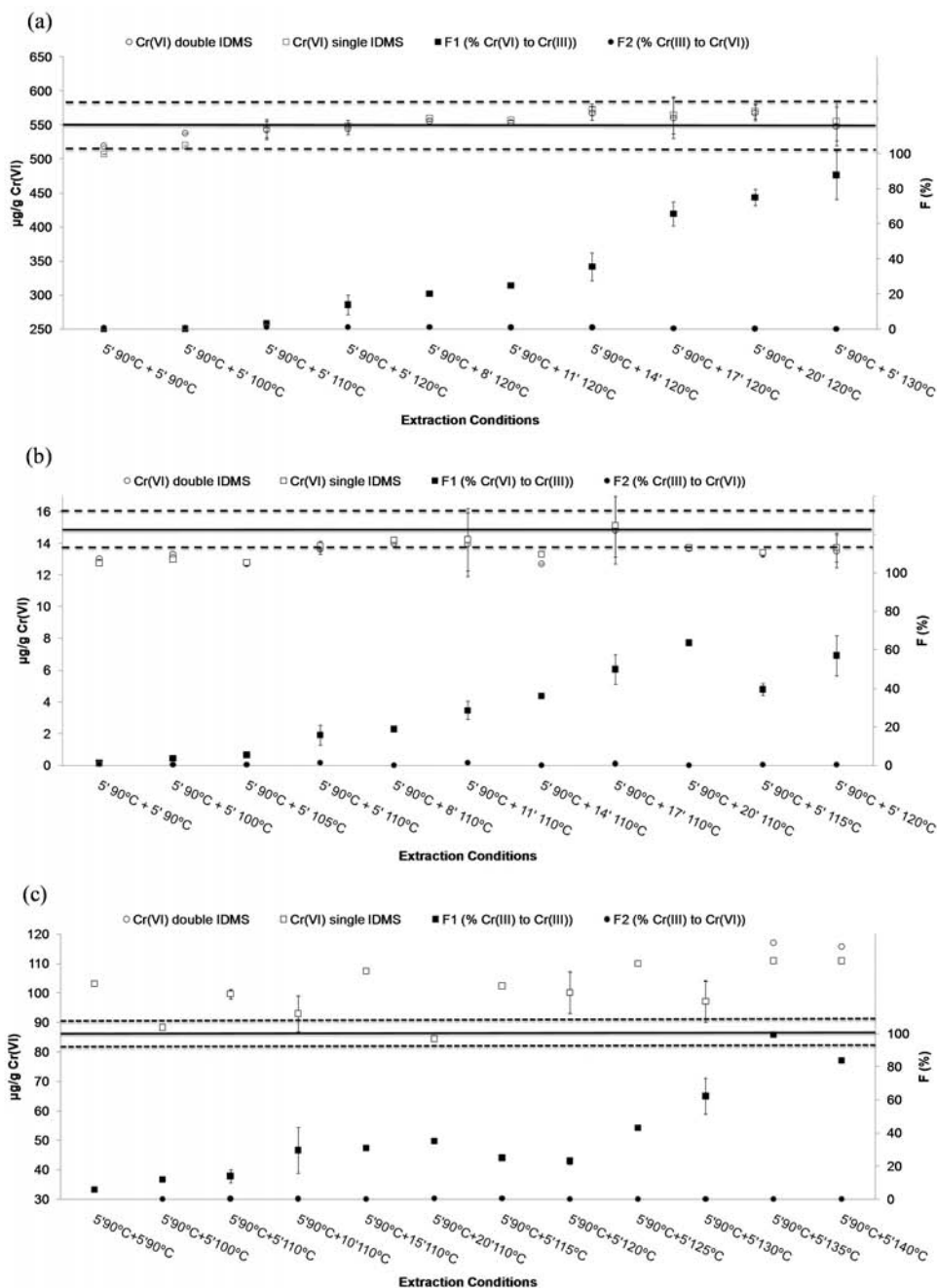


Figure 3. Optimization of the two-cycle microwave assisted extraction procedure in the analysis of (a) SRM 2701, (b) candidate SRM 2700, and (c) CRM-041.

Figure 3. (continued). Cr(VI) mass fraction is calculated both by single and double spiking isotope dilution mass spectrometry. Degradation factors F1(% Cr(VI) to Cr(III)) and F2 (%Cr(III) to Cr(VI)) are also represented. The certified values of Cr(VI) in SRM 2701 and CRM041 are represented as horizontal continuous lines and the associated uncertainty (1s) as dashed lines. Similarly, the preliminary certified interval (14.9 ± 1.2 mg/kg) for candidate SRM 2700 is represented.

In the analysis of SRM 2701 results in agreement with the certified values were obtained under all conditions tested (Figure 3a) even when almost 90% Cr(VI) reduction was observed (5 min/90 °C plus 5 min/130 °C). Similar quantitative results were observed for candidate SRM 2700 (Figure 3b) with respect to the preliminary certified interval. We also observed that the reduction of Cr(VI) to Cr(III) was sample dependent. For example, the second extraction cycle of 5 min at 120 °C induced more than 50% reduction of Cr(VI) in SRM 2700 but only 14% reduction was measured in SRM 2701. These results confirm that species interconversion reactions are matrix dependent as previously demonstrated for other elements such as Hg [24]. Temperatures higher than 140 °C in CRM-041, 130 °C in SRM 2701, and 120 °C in SRM 2700 in the second extraction cycle produced a complete reduction of Cr(VI) to Cr(III).

The results obtained for hexavalent chromium in CRM-041 (Figure 3c) were approximately 15% higher than the certified value for most extraction conditions tested. The content of extractable Cr(III) in this material was found to be lower than 4 µg/g under the different extraction conditions employed. Such a low value of Cr(III) in comparison with Cr(VI) rules out the overestimation of the Cr(VI) concentration because of a preferential oxidation of natural abundance endogenous Cr(III). In addition similar Cr(VI) concentrations were obtained in the absence (two cycles of 5 min/90 °C) and in the presence of a significant Cr(VI) reduction (see Figure 3c) demonstrating that a preferential $^{50}\text{Cr(VI)}$ reduction cannot explain the overestimation of the reference value.

Table 2. Mass Fraction of Cr(VI) and Degradation Factors F1 (%Cr(VI) to Cr(III)) and F2 (%Cr(III) to Cr(VI)) obtained by Single and Double Spike IDMS^a

Sample	Cr(VI) (µg/g) (double IDMS)	Cr(VI) (µg/g) (single IDMS)	F1 (% Cr(VI) to Cr(III))	F2 (% Cr(III) to Cr(VI))	Cr(VI) (µg/g) (certified)
SRM 2701 (high contaminated soil)	542 ± 14	545 ± 14	3.3 ± 0.4	1.1 ± 0.6	551.2 ± 34.5
Candidate SRM 2700 (low contaminated soil)	13.6 ± 0.6	13.9 ± 0.9	16 ± 5	1.3 ± 0.4	14.9 ± 1.2 ^a
BCR-545 (dust loaded on a filter)	45900 ± 1100	45900 ± 2200	8.4 ± 2.2	3.3 ± 0.6	40200 ± 600
BCR-545 (one week after extraction)	46200 ± 700	46200 ± 700	7.7 ± 2.0	3.4 ± 0.3	
CRM041 (sandy clay)	99.7 ± 1.6	99.7 ± 1.6	14 ± 4	0.34 ± 0.18	
CRM041 (one week after extraction)	103.4 ± 2.1	103.4 ± 2.1	17 ± 5	0.22 ± 0.21	86.40 ± 4.46
CRM041 (EPA 3060A extraction)	103 ± 3	104 ± 3	-	-	

^aThe uncertainty of the values corresponds to 1s standard deviation of six or three independent replicates (see text). ^a proposed certified value and expanded uncertainty.

3.3 Analysis of Reference Materials

According to the results obtained in Figures 2 and 3, a two-cycle microwave assisted extraction of 5 min at 90 °C plus 5 min at 110 °C was selected for the determination of hexavalent chromium in solid samples. These conditions represent the borderline between the absence and occurrence of Cr(VI) reduction in SRM 2701. Under these conditions the proposed methodology was applied to the analysis of four different solid matrices containing hexavalent chromium: the certified reference materials SRM 2701, candidate SRM 2700, CRM041, and CRM BCR-545. Due to its high cost, BCR-545, could not be employed for the optimization described in Figure 3. Six independent spiking and extraction experiments were performed on SRM 2701, candidate SRM 2700 and CRM-041, whereas only three independent replicates were performed in the analysis of CRM BCR-545. The stability of the sample extracts was studied by analyzing the extracts of BCR-545 and CRM 041 also after one week storage at 5 °C. The mass fraction of hexavalent chromium was calculated both by single and double spike IDMS and the results obtained are shown in Table 2 including the degradation factors for the double spike IDMS procedure.

The first conclusion to be obtained from these data is, again, the lack of $^{53}\text{Cr}(\text{III})$ oxidation in all cases except for BCR-545 filters in which a small oxidation factor of $3.3 \pm 0.6\%$ (1s) was obtained. Such a low factor can be considered almost negligible taking into account that $\pm 2\%$ standard deviation in an interconversion factor value is normally obtained in multiple spiking methodologies in the absence of degradation [24]. Thus, we observed no significant differences between the Cr(VI) mass fractions calculated by double spike IDMS and those obtained by single spike IDMS in all the analyzed materials. This confirms that the easier single spike IDMS procedure can be employed with the proposed methodology. However, it should be stressed that small oxidation rates in samples containing high fractions of Cr(III) can lead to important errors that single IDMS would not correct for.

Results in agreement with the certified values were obtained for candidate SRM 2700 and SRM 2701. It is worth noting that candidate SRM 2700 is an approximately 1:40 dilution of the SRM 2701 with ground high-purity quartz and such dilution factor is maintained when comparing the results obtained in this work for both materials using the same extraction conditions ($542 \pm 14 \mu\text{g/g}$ (1s) for SRM 2701 and $13.6 \pm 0.6 \mu\text{g/g}$ (1s) for candidate SRM 2700).

The results obtained for BCR-545 and CRM041 were ca. 10–15% higher than the certified Cr(VI) mass fractions. There are two possible sources of error that the proposed methodology cannot correct for (i) Cr(III) oxidation before complexation and (ii) direct oxidation of insoluble Cr(III) species in the solid phase. Experiments carried out by Korolczuk and Grabarczyk [16] showed that EDTA complexation prevented the oxidation of Cr(III) during alkaline extraction, whereas the same extraction without EDTA showed much higher Cr(VI) content because of Cr(III) oxidation. On the other hand, Dai et al. [25] reported on the oxidation of insoluble Cr(III) species such as $\text{Cr}(\text{OH})_3$, $\text{CrFe}(\text{OH})_6$, and CrPO_4 by the presence of manganese oxides. The rate of such oxidation reaction was reported to decrease when increasing pH. Under our experimental conditions in which the extraction procedure is carried out at pH 10 the Cr(III) direct oxidation is not favored but Cr(III) oxidation before complexation cannot be ruled out as a source of error. In the certification process of BCR-545 almost all laboratories performed alkaline extraction and only one laboratory performed IDMS [15]. In this case, the addition of the Cr(VI) spike was carried out after the alkaline extraction of the sample and not before. If there was Cr(VI) reduction to Cr(III) during the alkaline extraction it will not be compensated even by IDMS. Total chromium in the filters was determined by instrumental neutron activation analysis obtaining a value of $49.6 \pm 2.8 \text{ mg/g}$ (1s) [15] which is above the values found here (45.9–46.2 mg/g). It is worth mentioning also that this material did not contain a significant amount of Cr(III) so preferential oxidation of Cr(III) must be ruled out as the source of our bias.

In the case of CRM041 the material was certified using the EPA 3060A alkaline extraction method and the content of Cr(VI) determined colorimetrically using methods 7195, 7196A, and 7199 in a round-robin exercise in which 21 laboratories participated. It is worth mentioning that this materials did not contain significant amounts of Cr(III). Thus, a possible preferential oxidation of endogenous Cr(III) must be ruled out to justify these results. An overestimation of the Cr(VI) values could be only attributed to a faster reduction of Cr(VI) spike than the endogenous Cr(VI), however, as explained above, this must be excluded at least in the case of CRM041 because the same overestimation is obtained even in the absence of Cr(VI) reduction (Figure 3c). It is also important to remark that, during the certification process of NIST 2701, methods 7196A and 7199 provided Cr(VI) concentration values up to 40% lower than those obtained by Method 6800 employing double spike IDMS. In order to confirm our results with another extraction procedure, method EPA3060A was applied to CRM041 obtaining the results shown in the last line in Table 2. In this case, as no Cr(III) peak was detected in the chromatogram, no interconversion values could be calculated for this extraction procedure. As can be observed, values in agreement with the EDTA extraction were obtained. Finally, it is worth noting that an adequate stability of the sample extracts of BCR-545 and CRM041 was demonstrated after one week at 5 °C because the same Cr(VI) concentration values are obtained with the absence of further species interconversion.

In summary, we have demonstrated that Cr(III) is stabilized in all the extracting conditions tested so there is no need for the addition of an excess of isotopically enriched Cr(III) as in previously reported approaches [9–11]. Thus, only isotopically enriched Cr(VI) has to be added to the sample and the analysis cost and complexity is considerably lowered. This work has demonstrated that under the proposed experimental conditions single spike isotope dilution mass spectrometry, which is much easier to apply on a routine basis, provide the same level of accuracy and precision than the multiple spiking approaches currently employed for Cr speciation.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: 0034 985103484; e-mail: jiga@uniovi.es.

Present Address

Neus Fabregat-Cabello: Research Institute for Pesticides and Water, Universidad Jaume I, 12071, Castellón, Spain.

Author Contributions

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

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful for financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation through project ref. CTQ2009-12814 and to FICYT (Asturias) through project PC10-49. Fundació Caixa Castelló-Bancaixa is also acknowledged for the financial support through the project P1-1B2009-29. Pablo Rodríguez-González acknowledges his research contract to the Spanish Ministry of Science and Innovation through the Ramón y Cajal Program. **DISCLAIMER:** certain commercial equipment, instruments or materials are identified in this work to specify adequately the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by the National Institute of Standards and Technology, nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for this purpose.

ABBREVIATIONS

EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
IDMS	isotope dilution mass spectrometry
NIST	national institute of standards and technology
SRM	standard reference materials
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
EPA	Environmental Protection Agency
TIMS	thermal ionization mass spectrometry
CRM	certified reference materials
XANES	X-ray absorption near edge structure spectroscopy
INAA	instrumental neutron activation analysis
HPLC	high-performance liquid chromatography
IC	ion chromatography

REFERENCES

- [1] N. Unceta, F. Séby, J. Malherbe, O.F.X. Donard, Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review., *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 1097–1111.
- [2] M. Pettine, S. Capri, Digestion treatments and risks of Cr(III)–Cr(VI) interconversions during Cr(VI) determination in soils and sediments—a review, *Anal. Chim. Acta.* 540 (2005) 231–238.
- [3] Method 7196A: Chromium, Hexavalent (colorimetric). In *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW- 846, 3rd ed.*; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, (1995).
- [4] Method 3060A: Alkaline Digestion of Hexavalent Chromium. *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, SW-846, 3rd ed.*; U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC, (1995)
- [5] P. Rodríguez-González, J.M. Marchante-Gayón, J.I. García Alonso, A. Sanz-Medel, Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 60 (2005) 151–207.
- [6] R. Nusko, K.G. Heumann, Chromium speciation with isotope dilution mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 286 (1994) 283–290..
- [7] H.M. “Skip” Kingston, D. Huo, Y. Lu, S. Chalk, Accuracy in species analysis: speciated isotope dilution mass spectrometry (SIDMS) exemplified by the evaluation of chromium species, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 53 (1998) 299–309.
- [8] D. Huo, Y. Lu, H.M. Kingston, Determination and Correction of Analytical Biases and Study on Chemical Mechanisms in the Analysis of Cr(VI) in Soil Samples Using EPA Protocols, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 3418–3423.
- [9] D. Huo, H. Kingston, Correction of species transformations in the analysis of Cr(VI) in solid environmental samples using speciated isotope dilution mass spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5047–5054.
- [10] G.M.M. Rahman, H.M.S. Kingston, T.G. Towns, R.J. Vitale, K.R. Clay, Determination of hexavalent chromium by using speciated isotope-dilution mass spectrometry after microwave speciated extraction of environmental and other solid materials., *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1111–1120.
- [11] Method 6800: Elemental and Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry; United States Environmental Protection Agency: Washington, DC (2007).

- [12] K. Tirez, H. Scharf, D. Calzolari, R. Cleven, M. Kisser, D. Lück, Validation of a European standard for the determination of hexavalent chromium in solid material., *J. Environ. Monit.* 9 (2007) 749–759.
- [13] S.J. Nagourney, S. a. Wilson, B. Buckley, H.M.S. Kingston, S.-Y. Yang, S.E. Long, Development of a standard reference material for Cr(vi) in contaminated soil, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 1550.
- [14] J. Malherbe, M.-P. Isaure, F. Séby, R.P. Watson, P. Rodriguez-Gonzalez, P.E. Stutzman, et al., Evaluation of Hexavalent Chromium Extraction Method EPA Method 3060A for Soils Using XANES Spectroscopy., *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 10492–10500
- [15] J.M. Christensen, K. Byrialsen, K. Vercoutere, R. Cornelis, Certification of Cr (VI) and total leachable Cr contents in welding dust loaded on a filter (CRM 545), *J. Anal. Chem.* (1999) 28–32.
- [16] M. Korolczuk, M. Grabarczyk, Evaluation of ammonia buffer containing EDTA as an extractant for Cr(VI) from solid samples., *Talanta.* 66 (2005) 1320–1325.
- [17] M. Grabarczyk, M. Korolczuk, K. Tyszczyk, Extraction and determination of hexavalent chromium in soil samples., *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 357–362.
- [18] M. Grabarczyk, Protocol for Extraction and Determination of Cr(VI) in Solid Materials with a High Cr(III)/Cr(VI) Ratio Using EDDS as a Leaching Agent for Cr(VI) and a Masking Agent for Cr(III), *Electroanalysis.* 20 (2008) 1857–1862.
- [19] J.I. García Alonso, Determination of fission products and actinides by inductively coupled plasma-mass spectrometry using isotope dilution analysis : a study of random and systematic errors, *Anal. Chim. Acta.* 312 (1995) 57–78.
- [20] P. Rodríguez-González, A. Rodríguez-Cea, J.I.G. Alonso, A. Sanz-Medel, Species-specific isotope dilution analysis and isotope pattern deconvolution for butyltin compounds metabolism investigations., *Anal. Chem.* 77 (2005) 7724–7734.
- [21] J. Meija, L. Yang, J. a. Caruso, Z. Mester, Calculations of double spike isotope dilution results revisited, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 1294–1297.
- [22] P. Rodríguez-González, M. Monperrus, J.I. García Alonso, D. Amouroux, O.F.X. Donard, Comparison of different numerical approaches for multiple spiking species-specific isotope dilution analysis exemplified by the determination of butyltin species in sediments, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 1373–1382.
- [23] P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, Recent advances in isotope dilution analysis for elemental speciation, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 25 (2010) 239–259.

- [24] Á. Castillo, P. Rodríguez-González, G. Centineo, A.F. Roig-Navarro, J.I. García Alonso, Multiple spiking species-specific isotope dilution analysis by molecular mass spectrometry: simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues., *Anal. Chem.* 82 (2010) 2773–2783.
- [25] R. Dai, J. Liu, C. Yu, R. Sun, Y. Lan, J.-D. Mao, A comparative study of oxidation of Cr(II) in aqueous ions, complex ions and insoluble compounds by manganese-bearing mineral (birnessite), *Chemosphere.* 76 (2009) 536–541.

2.3 Bibliografía

1. Enghag, P. *Encyclopedia of the elements: technical data, history, processing, applications*. 574–578 (Wiley-VCH, 2004).
2. Jerome O. Nriagu, E. N. *Chromium in the Natural and Human Environments*. 571 (Wiley, 1988).
3. U.S. Geological Survey. *Mineral Commodity Summaries 2014*. 42–43 (2014). at <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/chromium/mcs-2014-chrom.pdf>
4. U.S. Environmental Protection Agency. California Regulations Related to Drinking Water. (2014). at http://www.waterboards.ca.gov/drinking_water/certlic/drinkingwater/documents/lawbook/dwregulations-2014-07-01.pdf
5. Ministerio de Medio Ambiente y Medio rural. Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas. (2013).
6. U.S. Environmental Protection Agency. *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods*. 1–7 (2004). at <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/chap7.pdf>
7. Unceta, N., Séby, F., Malherbe, J. & Donard, O. F. X. Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 1097–1111 (2010).

8. Ball, J. W. & Nordstrom, D. K. Critical Evaluation and Selection of Standard State Thermodynamic Properties for Chromium Metal and Its Aqueous Ions, Hydrolysis Species, Oxides, and Hydroxides. *J. Chem. Eng. Data* **43**, 895–918 (1998).
9. Pettine, M. & Capri, S. Digestion treatments and risks of Cr(III)–Cr(VI) interconversions during Cr(VI) determination in soils and sediments—a review. *Anal. Chim. Acta* **540**, 231–238 (2005).
10. Huo, D., Lu, Y. & Kingston, H. M. Determination and Correction of Analytical Biases and Study on Chemical Mechanisms in the Analysis of Cr(VI) in Soil Samples Using EPA Protocols. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 3418–3423 (1998).
11. 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.* **72**, 5047–5054 (2000).
12. Kingston, H. M. & City, E. Method of speciated isotope dilution mass spectrometry. US Patent 5414259. (1995).
13. U.S. Environmental Protection Agency. *Method 6800: Elemental and Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry*. 1–47 (2007).

Capítulo 3

Análisis de disruptores endocrinos en aguas medioambientales



3.1 Introducción

Durante las últimas décadas la producción a nivel mundial de productos químicos se ha visto incrementada de forma exponencial. A pesar de que la mayoría de los compuestos producidos son beneficiosos para el ser humano, otros muchos suponen un riesgo tanto para la salud pública como para el medio ambiente, pues tienen naturaleza tóxica, son persistentes y se bioacumulan en los seres vivos. Entre estos últimos, existen compuestos capaces de afectar al correcto funcionamiento de los procesos biológicos de plantas, animales e incluso de las personas.

Las sustancias químicas exógenas que alteran la función del sistema endocrino y por tanto causan efectos adversos en la salud de un organismo se conocen como disruptores endocrinos (EDCs, *Endocrine Disrupting Chemicals*). Este término fue acuñado por primera vez en 1991 en un congreso en Winsconsin, EEUU, mediante una sesión titulada “Chemically Induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection” impartida por Theo Colborn¹, en la que se destacó el problema de cómo distintos compuestos químicos podían estar afectando a la reproducción y al desarrollo de la salud humana y de animales. Como consecuencia directa, desde ese momento y hasta la actualidad, los EDCs han sido considerados como uno de los mayores desafíos medioambientales existentes².

Hoy en día dentro de este grupo se incluye a una gran variedad de sustancias químicas de muy diverso origen, estructura y uso, que pueden ser tanto de origen natural como sintético. Así, entre los más habituales se encuentran los compuestos organoclorados (DDT, Dicloro Difenil Tricloroetano o los PCBs,

policlorobifenilos), los plastificantes (bisfenol A, ftalatos), detergentes (alquilfenoles) y píldoras para el control de la natalidad (etinil estradiol). No obstante, aún no existe una lista definida que incluya a todos los compuestos de este tipo ya que las nuevas necesidades de mercado provocan una aparición constante de nuevos compuestos.

A pesar del creciente interés de este tipo de contaminantes dentro de la comunidad científica, y de la numerosa investigación realizada durante las dos últimas décadas en torno a ellos, aún existen diversas lagunas. Los estudios epidemiológicos realizados hasta el momento no han permitido establecer una relación causal entre la exposición a estos compuestos y la aparición de ciertas patologías. Por ejemplo, todavía no han sido estudiados de forma exhaustiva los mecanismos que predicen la acción hormonal implicada en enfermedades causadas por EDCs, el nivel de exposición de la población general, la identificación de un nivel umbral de efecto o los mecanismos de acción y sus efectos adversos³.

Estudios recientes muestran que los compuestos disruptores endocrinos se comportan como estrógenos, es decir, interfieren principalmente con la hormona femenina 17β -estradiol (ver Figura 3.1). Dado que los EDCs son liposolubles y poseen pesos moleculares bajos, estos compuestos son capaces de imitar a las hormonas, uniéndose a los receptores hormonales.

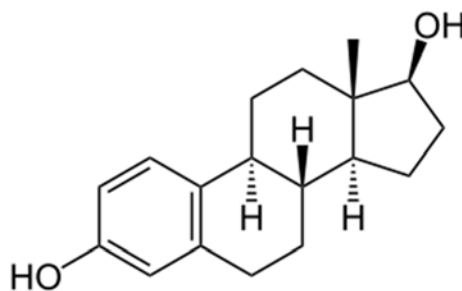


Figura 3.1 Estructura molecular del estrógeno más importante en los mamíferos, el 17β -estradiol.

Otra característica común de todos los EDCs es que todos contienen como mínimo un anillo aromático en su estructura.

De forma general, los efectos hormonales de los disruptores endocrinos pueden ser debidos a que: 1) mimetizan los efectos de hormonas endógenas (efecto agonista) 2) antagonizan la acción normal de las hormonas, es decir, pueden unirse a un receptor sin activarlo 3) alteran el patrón de síntesis y metabolismo de hormonas naturales, y/o 4) modifican los niveles respuesta de los receptores hormonales. Todos estos procesos pueden consultarse de forma esquematizada en la Figura 3.2³.

Según la guía actual de la OMS titulada “Estado de la ciencia de los compuestos disruptores endocrinos”² son numerosas las alteraciones que pueden ocasionar los EDCs en los organismos en los seres vivos, las cuales incluyen las principales enfermedades hormono-dependientes: disfunciones tiroideas, alteraciones en el crecimiento, aumento en la incidencia de problemas relacionados con el tracto reproductor masculino, disminución de la fertilidad, pérdida en la eficacia del apareamiento, anomalías del comportamiento, alteraciones metabólicas evidentes desde el nacimiento, desmasculinización, feminización y alteraciones del sistema inmune, e incluso incremento en la incidencia de diferentes tipos de tumores.

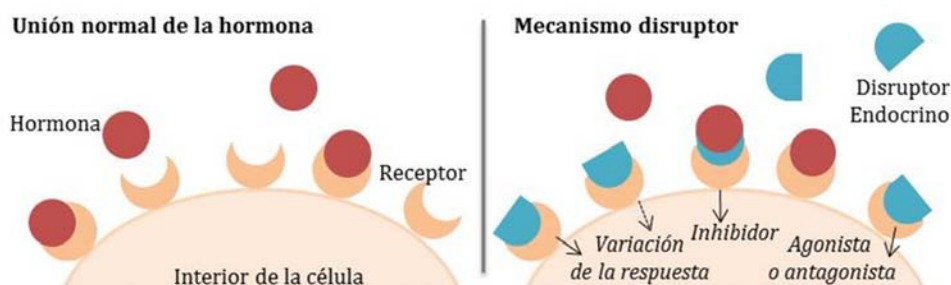


Figura 3.2 Procesos de mimetización de las hormonas (adaptado de Sosa-Ferrera et al. 2013)

Todos los problemas citados anteriormente se suman al hecho de que la presencia de disruptores endocrinos en el medio acuático es casi omnipresente, aumentándose aún más la preocupación sobre estos compuestos. Existen diversas formas de llegada de estos compuestos al agua, pero normalmente son los vertidos incontrolados la mayor fuente de transferencia hasta el medioambiente. Otras fuentes son la excreción así como la eliminación inadecuada de fármacos en el ámbito doméstico, la escorrentía de actividades agropecuarias, los efluentes de industrias así como movimientos de agua causados por fenómenos atmosféricos⁴.

La forma más habitual de reducir los niveles de estos compuestos en el medioambiente se basa en los tratamientos realizados en las estaciones depuradoras de aguas residuales. No obstante, la presencia de estos compuestos en los efluentes es habitual por lo que se están estudiando tratamientos más exhaustivos como la ozonización, la oxidación selectiva o el uso de filtros de carbono activo⁴. Por otra parte debe tenerse en cuenta que a causa de las características apolares e hidrofóbicas de la mayoría de EDCs, estos tienden a ser acumulados en los lodos de la depuradora, hecho que los convierte en una fuente de contaminación añadida.

El principal problema de los EDCs radica en que sus efectos nocivos se han observado a concentraciones a nivel de traza (ng/L), afectando tanto a la salud humana como a un gran número de ecosistemas, principalmente el acuático. En el caso de los humanos, la forma más habitual de estos para alcanzar el organismo es mediante la ingesta de agua potable. Por otro parte, debe tenerse también en cuenta que suele darse la actuación simultánea de diversos disruptores, lo que provoca la necesidad de reducir aún más los niveles permitidos en aguas de consumo humano.

Como consecuencia directa de los perjuicios para la salud que suponen los EDCs se han elaborado distintas legislaciones en torno a las aguas superficiales. Dentro de la Unión Europea ésta queda recogida en la Directiva

Marco Europea del Agua⁵, que nace como respuesta a la necesidad de unificar las actuaciones en materia de gestión de agua. A modo de ejemplo, en el caso de octilfenol y nonilfenol, los niveles máximos permitidos en aguas superficiales son de 0.1 µg/L y 0.3 µg/L respectivamente. De forma análoga la EPA ha regulado las concentraciones máximas permitidas de nonilfenol en aguas en Estados Unidos, estableciendo dos niveles: 28 µg/L como concentración máxima puntual en aguas superficiales y 6.6 µg/L en exposiciones agudas⁶. No obstante, ninguna de las legislaciones citadas anteriormente establece criterios para otros disruptores reconocidos como es el caso del bisfenol A, hecho que obliga a realizar constantes revisiones de estas regulaciones.

Metodologías de análisis

La correcta determinación de EDCs resulta aún hoy en día un reto analítico ya que implica alcanzar niveles de cuantificación a nivel de trazas y ultratrazas (µg/L o ng/L), normalmente en matrices altamente complejas. Además, la presencia ubicua de estos compuestos no suele permitir encontrar matrices libres de ellos y a menudo es necesario lidiar con altos niveles de contaminación incluso en el material de laboratorio, como ocurre en el caso del análisis de plastificantes o detergentes.

De forma general, los avances realizados en el campo de la instrumentación durante las últimas décadas se han traducido, en el campo del análisis de EDCs, en mejoras en la detección, identificación inequívoca y cuantificación de este tipo de compuestos. Como ya se ha comentado en la introducción, estos avances van ligados sobre todo a las mejoras introducidas tanto en cromatografía líquida como en espectrometría de masas, siendo este acoplamiento el utilizado de forma predominante en la actualidad para el análisis de este tipo de compuestos.

Para la detección de EDCs, la espectrometría de masas simple (Q) en modo SIM ha sido ampliamente utilizada dadas las características inherentes a ésta técnica analítica. No obstante, como consecuencia de la alta complejidad de las muestras en la mayoría de los casos, la espectrometría de masas en tándem (QqQ) se ha impuesto ya que permite obtener una mayor selectividad y una clara mejora en la identificación de los compuestos objetivo (conocidos).

En cuanto a la identificación de nuevos compuestos, las tendencias más actuales se basan en el uso de la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, *High-resolution mass spectrometry*), incluyendo a los analizadores de tipo sector magnético, a los de tiempo de vuelo (TOF, *time of flight*) y al orbitrap⁷. Más recientemente se han utilizado técnicas híbridas de espectrometría de masas para la identificación de nuevos compuestos, tales como el acoplamiento Q-TOF⁸, que permite un nivel de certeza aún superior pues proporciona espectros de iones producto en modo masa exacta.

De forma paralela, las características de la cromatografía líquida han evolucionado hacia tiempos de separación más bajos manteniendo los mismos niveles de resolución y de eficiencia de separación. Una de las formas de reducir el tiempo de análisis ha sido mediante el uso de columnas monolíticas HPLC que a diferencia de las habituales no contienen partículas, pudiéndose trabajar a flujos mucho más elevados (hasta 10 mL/min) sin empeorar las características cromatográficas y reduciendo los tiempos de estabilización entre gradientes. Sin embargo, la forma de trabajo predominante continúa siendo la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC), que reduce considerablemente el tiempo de análisis utilizando tamaños de partícula por debajo de las 2 μm . Por otra parte una de las tendencias actuales radica en el uso de columnas de interacción hidrofílica o HILIC (*Hydrophilic Interaction Chromatography*), que se caracterizan por tener un mayor rango de selectividad en compuestos con muy distinto comportamiento⁹. Estas destacan por su capacidad para retener compuestos muy polares mediante disolventes típicos de cromatografía de fase inversa. No obstante, aún es necesario mejorar

la estabilidad de esta fase estacionaria para aumentar la vida útil de las columnas.

Finalmente, la preparación de las muestras para analizar EDCs es necesaria por tres razones: la eliminación de interferentes, el enriquecimiento de los compuestos para alcanzar los límites de detección estipulados por la legislación y el cambio de disolvente en el caso de que sea necesario. Tal y como se ha señalado en la introducción, las formas más comunes de tratamiento de muestra actuales van encaminadas hacia la automatización, el uso de sorbentes avanzados y a la aplicación de técnicas de química verde.

En los apartados siguientes se presentan tres trabajos en los que se ha hecho uso del acoplamiento UHPLC-MS/MS con analizador de triple cuadrupolo para la determinación cuantitativa de EDCs. En el primero de ellos se ha desarrollado un método para la cuantificación de la mezcla técnica de nonilfenol mediante la síntesis de uno de los isómeros que la componen marcado con un carbono-13. En el segundo, se ha ampliado el método con un segundo alquilfenol, el t-octilfenol y también se ha sintetizado su análogo con un carbono-13. Finalmente, se ha incluido el bisfenol A junto a los alquilfenoles anteriores y se han estudiado y optimizado dos metodologías de extracción, la SPE y la HF-LPME. Todos los compuestos estudiados fueron cuantificados mediante IPD en matrices de alta complejidad, estudiando distintos tratamientos de muestra.

3.2 Determinación de nonilfenol en aguas por dilución isotópica haciendo uso de su análogo marcado isotópicamente con un solo carbono-13

Entre los cientos de compuestos catalogados como disruptores endocrinos se encuentra el nonilfenol. La determinación de la mezcla técnica presente en el medio ambiente así como la síntesis del isómero escogido como patrón interno marcado isotópicamente se describen en el segundo artículo científico incluido en esta tesis.

Bajo el nombre de nonilfenol (NP) se engloba a toda una familia de compuestos fenólicos en los que existe una cadena alquílica, más o menos ramificada, con nueve carbonos. Los nonilfenoles, y los alquilfenoles en general, han sido ampliamente utilizados como materia prima desde los años 60 para obtener antioxidantes y aceites lubricantes, siendo su principal uso la obtención de etoxilatos de nonilfenol¹⁰. Estos derivados etoxilados, conocidos de forma genérica como alquiletoxilatos (APEO de las siglas en inglés), son compuestos tensioactivos no iónicos y se caracterizan por su capacidad para reducir la tensión superficial y formar parte de la interfase entre las partes hidrofóbicas e hidrofílicas en las emulsiones. Dadas las propiedades de los APEO su uso se ha extendido en la elaboración de detergentes, emulsificantes y solubilizantes. La forma más habitual de obtener el nonilfenol consiste en la alquilación de mezclas de noneno obtenidas a partir de la pirolisis de la gasolina y de otros productos petroquímicos¹¹. Como consecuencia este proceso origina un conjunto de nonilfenoles para-sustituídos de excelentes propiedades técnicas conocido como mezcla técnica de nonilfenol.

El interés por monitorizar los niveles de nonilfenol en aguas surgió a partir del año 1984 cuando Giger et al.¹² establecieron que los productos de degradación de los nonilfenoletoxilatos, los nonilfenoles, eran más tóxicos para el medio acuático que sus predecesores. Como consecuencia de éste y de otros muchos

estudios, la producción de nonilfenol y de su derivado etoxilado fue restringida en la Unión Europea tal y como se recoge en la directiva 2003/53/EC¹³. Además, el nonilfenol fue catalogado como una sustancia peligrosa prioritaria dentro de la Directiva Marco del Agua, la cual regula los niveles máximos en aguas de uso público. En esta regulación se recogen los parámetros de calidad medioambiental (EQS) para un gran número de contaminantes en aguas, estableciéndose tanto las concentraciones máximas permitidas como las puntuales en distintos tipos de aguas. Estos valores se pueden consultar en la Tabla 3.1.

De la Tabla 3.1 cabe destacar la inclusión del n-nonilfenol (el isómero lineal), con número CAS 104-40-5, que es un compuesto sin interés tecnológico y que no se observa en las muestras de aguas medioambientales a diferencia de la mezcla técnica (25154-52-3 y 84852-15-3). Por otra parte, estos niveles tan bajos de concentración legislados en aguas, unidos a la necesidad de un control exhaustivo de todas las fuentes de contaminación que surgen tanto durante el tratamiento de muestra como durante su determinación, han originado que la determinación de nonilfenol aún sea complicada.

Uno de los problemas con los que debemos enfrentarnos radica en la selección del patrón, la sustancia de referencia en la determinación analítica. La selección del patrón de cuantificación es un aspecto clave y debe ser abordado

Tabla 3.1 Criterios de calidad medioambiental⁵ para el nonilfenol en distintos tipos de agua.

Números CAS a los que aplica	Promedio anual		Concentración máxima puntual permitida	
	Aguas continentales superficiales	Otros tipos de aguas	Aguas continentales superficiales	Otros tipos de aguas
25154-52-3				
104-40-5	0.3 µg/L	0.3 µg/L	2 µg/L	2 µg/L
84852-15-3				

con detenimiento¹⁴⁻¹⁶. Para una correcta cuantificación y, si así se considera, una adecuada evaluación de los posibles efectos sobre la salud humana y el medio ambiente, cabe tener en cuenta los siguientes aspectos:

- La composición de la mezcla técnica depende del fabricante y del lote de producción.
- La estabilidad en el medio (tanto a ataques físico-químicos como bacterianos) depende de cada isómero concreto. Parece ser que los menos ramificados y los de mayor ramificación que presenten impedimentos estéricos sobre el carbono- α (el de la cadena alquílica que se encuentra unido al anillo aromático), son más persistentes en el medio.
- El comportamiento en el espectrómetro de masas está afectado por el efecto matriz y por el patrón de fragmentación. Ambos dependen del isómero concreto.

Todo ello dificulta la selección del patrón para llevar a cabo la determinación de estos compuestos, puesto que, en función del patrón escogido, los resultados cuantitativos y cualitativos pueden ser diferentes.

En la presente tesis se aborda la problemática planteada a través de la selección de uno de los isómeros y de la síntesis de su análogo marcado isotópicamente. Con ello se asegura la coelución cromatográfica y, por tanto, la minimización del efecto matriz. Sin embargo, queda claro que sólo se cuantificará correctamente a aquellos isómeros que presenten el mismo patrón de fragmentación. La evaluación del potencial disruptor endocrino queda fuera del alcance y del propósito del presente trabajo.

La selección del isómero se ha llevado a cabo atendiendo a la existencia de productos comerciales de partida, a la facilidad y viabilidad de la síntesis en un espacio corto de tiempo y a la información bibliográfica disponible respecto de su uso y su representatividad dentro de la mezcla técnica. El isómero finalmente seleccionado ha sido el 4-(3,6-dimetil-3-heptil)fenol.

Desarrollo experimental

Como se podrá consultar a continuación, en el segundo artículo científico incluido en esta tesis se ha desarrollado y validado un método de análisis para la determinación de la mezcla técnica de nonilfenol en aguas residuales a los niveles establecidos por la legislación vigente. Para ello se ha utilizado la extracción en fase sólida (SPE) en modo *off-line* como método de extracción y concentración del analito, seguida de su análisis mediante UHPLC-ESI-MS/MS.

La metodología propuesta supone una alternativa a la cuantificación mediante curva de calibrado tradicional, ya que se realiza la cuantificación mediante deconvolución de perfiles isotópicos con $^{13}\text{C}_1$ -nonilfenol. Para demostrar la aplicabilidad de este método se validó en matrices altamente complejas como las aguas residuales, tanto de entrada (influyente) como de salida (efluente). Las muestras de aguas residuales fueron tomadas en la estación depuradora de aguas residuales de Castellón, mediante un convenio establecido entre la sociedad FACSA y nuestro grupo de investigación.

En primer lugar se utilizó SPE para poder alcanzar la sensibilidad adecuada. De forma general, dicho procedimiento se basa en la retención en la fase sólida (o sorbente) de los compuestos de interés tras pasar la muestra acuosa, para ser finalmente eluidos en un volumen menor de disolvente. El procedimiento habitual está basado en las siguientes etapas: 1) acondicionamiento de los cartuchos con metanol, 2) paso de la muestra en fase acuosa, 3) lavado para la eliminación de interferentes retenidos y 4) elución de los analitos, normalmente con acetonitrilo, acetona o metanol. En este trabajo se introdujo una etapa previa al acondicionamiento de los cartuchos basada en el lavado de éstos (y de los adaptadores acoplados a estos) con acetona para reducir la contaminación observada de nonilfenol. Por otra parte, se eliminó la etapa de lavado de interferentes para reducir el tiempo de manipulación de muestra y evitar pérdidas de analitos. En cuanto al sorbente, se utilizaron cartuchos que contenían como sorbente sílica C18 ya que presentaron una

mayor retención de los analitos frente a otros cartuchos de tipo polimérico también evaluados. Entre los diferentes solventes de elución ensayados se seleccionó al metanol, ya que ofreció los mejores valores de recuperación en términos absolutos. Además, la evaporación del extracto hasta un volumen de 0.5 mL permitió su introducción directa en el sistema de medida.

La técnica SPE destaca por su fiabilidad, gran variedad de sorbentes y facilidad de manejo. Estas características se traducen en una elevada aplicación en laboratorios de rutina. No obstante la modalidad *off-line* tiene la gran desventaja de necesitar largos tiempos de tratamiento de muestra que pueden alargarse incluso a toda la jornada laboral.

Por otro lado, las condiciones cromatográficas fueron optimizadas para seleccionar finalmente condiciones isocráticas. La composición de la fase móvil fue metanol:agua (95:5), y se utilizó 0.01% de NH_3 y 0.1mM de NH_4Ac como modificadores. La aplicación de gradientes generaba, durante el ciclo cromatográfico, la acumulación de restos del compuesto presente a nivel de ultratrazas en reactivos y en el agua desionizada.

La principal mejora introducida en este método, respecto a procedimientos anteriores, recae en el desarrollo de un método cuantitativo basado en la deconvolución de perfiles isotópicos. Además, siguiendo los principios del marcaje isotópico mínimo, se sintetizó un isómero no comercial del nonilfenol con sólo un carbono-13. Esta alternativa a los ILIS tradicionales (marcados con varios carbonos o deuterios) busca minimizar la presencia de posibles efectos isotópicos a lo largo del análisis. Además, esta cuantificación se comparó con la realizada utilizando el n-nonilfenol a modo de patrón interno. Se observó que los cálculos por IPD reducían de forma considerable el tiempo de análisis y que el uso de un análogo enriquecido con un carbono-13 permitía corregir correctamente todo el proceso analítico así como el efecto matriz.

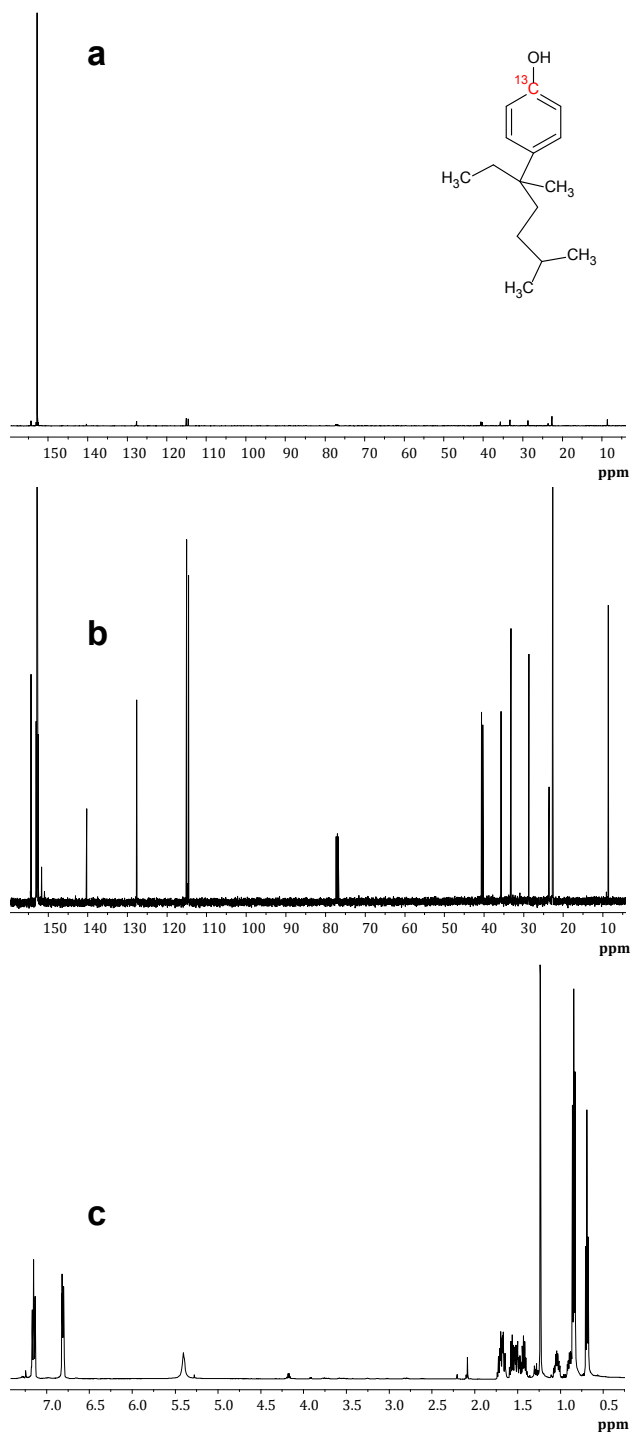
Finalmente, la metodología fue validada a dos niveles (0.1 y 1 µg/L) mediante ensayos de fortificación en aguas residuales tanto de influente como efluente, así como agua embotellada.

Síntesis y caracterización del $^{13}\text{C}_1$ -nonilfenol

La síntesis del isómero escogido como patrón, $^{13}\text{C}_1$ -4-(3,6-dimetil-3-heptil)fenol (o $^{13}\text{C}_1$ -NP), se basó en una alquilación Friedel-Craft del $^{13}\text{C}_1$ -fenol con un nonilalcohol terciario, utilizando trifloruro de boro a modo de catalizador. La reacción realizada puede ser consultada más adelante, en el segundo artículo científico incluido en esta tesis.

En cuanto a su caracterización estructural, ésta se realizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) tanto de carbono-13 como de protón. En términos generales, la RMN consiste en la técnica analítica que aporta mayor información estructural en cuanto a la posición y entorno de los átomos de ^{13}C y ^1H . Se basa en la distinta resonancia observada para estos núcleos cuando se les aplica un campo magnético en función de su entorno. Así, un simple análisis por RMN de protón permite saber el tipo de protón (por su desplazamiento en ppm), cuántos protones hay unidos a los carbonos contiguos (por la multiplicidad) y cuántos protones hay de cada tipo (por la integración). Por otro lado, a partir del análisis de RMN de ^{13}C se obtienen los desplazamientos de los distintos carbonos, complementando el análisis ^1H por RMN. Tal y como se puede apreciar en la Figura 3.1 a), en este trabajo destaca la alta señal obtenida para el ^{13}C del fenol, mucho más intensa que el resto de picos. Su intensidad tan alta se debe a que el 98% de átomos de esta posición son ^{13}C , mientras que en el resto son solo el porcentaje natural, un 1.1%. Esto originó además un hecho insólito en el ^{13}C RMN: el desdoblamiento de los carbonos cercanos al ^{13}C , tal y como se observa de forma habitual en la multiplicidad del ^1H . La descripción completa de todas las señales se puede consultar en el artículo 2.

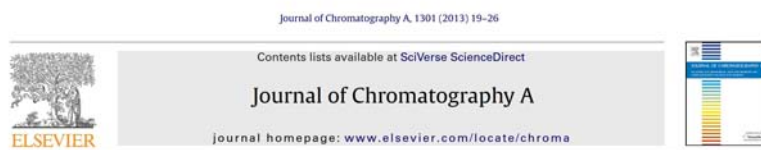
En último término todo el proceso de análisis de los espectros obtenidos fue facilitado gracias a la utilización del software MestReNova© que además es capaz de simular los espectros de cualquier molécula a partir de su estructura. De esta forma fue posible la interpretación de los espectros obtenidos tras la resonancia magnética nuclear así como la asignación de cada tipo de protón y carbono contenidos en el producto sintetizado análogo.



3.2.1 Artículo científico 2

Fast methodology for the reliable determination of nonylphenol in water samples by minimal labeling isotope dilution mass spectrometry.

Fabregat-Cabello, N., Castillo, Á., Sancho, J. V., González, F. V. & Roig-Navarro, A.F. *Journal of Chromatography A* 2013, 1301, 19–26.



Fast methodology for the reliable determination of nonylphenol in water samples by minimal labeling isotope dilution mass spectrometry[☆]



Neus Fabregat-Cabello^a, Ángel Castillo^a, Juan V. Sancho^a, Florenci V. González^b, Antoni Francesc Roig-Navarro^{a,*}

^a Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071 Castellón, Spain
^b Departament de Química Inorgànica i Orgànica, Universitat Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 21 January 2013
 Received in revised form 17 April 2013
 Accepted 16 May 2013
 Available online 22 May 2013

Keywords:
 Nonylphenol
 Isotope dilution mass spectrometry
 Minimal labeling
 Isotope pattern deconvolution
 LC-MS/MS
 Wastewater analysis

ABSTRACT

In this work we have developed and validated an accurate and fast methodology for the determination of 4-nonylphenol (technical mixture) in complex matrix water samples by UHPLC-ESI-MS/MS. The procedure is based on isotope dilution mass spectrometry (IDMS) in combination with isotope pattern deconvolution (IPD), which provides the concentration of the analyte directly from the spiked sample without requiring any methodological calibration graph. To avoid any possible isotopic effect during the analytical procedure the in-house synthesized ¹³C₄-4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol was used as labeled compound. This proposed surrogate was able to compensate the matrix effect even from wastewater samples. A SPE pre-concentration step together with exhaustive efforts to avoid contamination were included to reach the signal-to-noise ratio necessary to detect the endogenous concentrations present in environmental samples. Calculations were performed acquiring only three transitions, achieving limits of detection lower than 100 ng/g for all water matrix assayed. Recoveries within 83–108% and coefficients of variation ranging from 1.5% to 9% were obtained. On the contrary a considerable overestimation was obtained with the most usual classical calibration procedure using 4-n-nonylphenol as internal standard, demonstrating the suitability of the minimal labeling approach.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nonylphenols (NPs) are degradation products of non-ionic surfactants, NP polyethoxylates, which have been widely used in the production of detergents, plastics, textiles, paper and agricultural chemical products. Since they are able to mimic the structure of the natural hormone 17β-estradiol, which confers on them endocrine disrupting capabilities [1], NPs have been included in the list of priority substances in the Water Framework Directive (WFD) [2] and in the Directive of Environmental Quality Standards (EQSD) [3]. The new proposal for a Directive amending the WFD and EQSD (COM(2011)876) [4] legislates the mixture of isomers nonylphenol (CAS 25154-52-3) including isomers 4-nonylphenol (linear) (CAS 104-40-5) and 4-nonylphenol (branched) (CAS 84852-15-3). Nevertheless, as far as we know the linear isomer has not been detected in water samples at significant concentrations and its estrogenic

power is lower than in branched isomers [5]. Therefore, the evaluation of the harmful effects of NPs is focused on the determination of technical NP (NP), consisting mainly in a mixture of branched para-isomers (>90%) [5,6].

Due to the ubiquitous presence of NP [1,7] and the low levels required to assess the EQS for these compounds in a great variety of complicated matrices, the development of adequate analytical methods to determine NP is still a challenge [5,6,8,9].

Both GC-MS [6,8–10] equipped with a single quadrupole and LC-MS [11] with single quadrupole or LC-MS/MS [5,7–9,12–14] with a triple quadrupole (QqQ) have been widely used to quantify NP in environmental samples. Nevertheless, LC techniques are preferred over GC-MS because there is no need to perform any derivatization step, which increases the total analysis time and may show low yields in complex matrices [10]. On the other hand, in UHPLC-MS/MS the overall NP isomers elute as a single chromatographic peak, making possible the simultaneous quantification of NP with the same fragmentation pathway. Normally, an off-line preconcentration step by solid-phase extraction (SPE) is required to allow the determination of NP at the levels established in the legislation.

[☆] Presented at the XII Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Tarragona, Spain, 14–16 November 2012.
 * Corresponding author. Tel.: +34 964 387 359; fax: +34 964 387 368.
 E-mail address: roig@uji.es (A.F. Roig-Navarro).

Reproduced with permission from: *J. Chromatogr. A*, 2013, 1301, pp 19–26.
 Copyright © 2013 Elsevier B.V. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.033>

Fast methodology for the reliable determination of nonylphenol in water samples by minimal labeling isotope dilution mass spectrometry¹

Journal of Chromatography A 1301 (2013), 19–26

Neus Fabregat-Cabello,^a Ángel Castillo,^a Juan V. Sancho,^a Florenci V. González,^b Antoni Francesc Roig-Navarro. ^{*,a}

^aResearch Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071, Castellón, Spain.

^bDepartament de Química Inorgànica i Orgànica, Universitat Jaume I, E-12071, Castellón, Spain

¹Presented at the XII Scientific Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Tarragona, Spain, November 2012.

ABSTRACT

In this work we have developed and validated an accurate and fast methodology for the determination of 4-nonylphenol (technical mixture) in complex matrix water samples by UHPLC-ESI-MS/MS. The procedure is based on Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) in combination with Isotope Pattern Deconvolution (IPD), which provides the concentration of the analyte directly from the spiked sample without requiring any methodological calibration graph. To avoid any possible isotopic effect during the analytical procedure the in-house synthesized ¹³C₁-4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol) was used as labeled compound. This proposed surrogate was able to compensate the matrix effect even from wastewater samples. A SPE pre-concentration step together with exhaustive efforts to avoid contamination were included to reach the signal-to-noise ratio necessary to detect the endogenous concentrations present in environmental samples. Calculations were performed acquiring only three transitions, achieving limits of detection lower than 100 pg/g for all water matrix assayed. Recoveries within 83-108% and coefficients of variation ranging from 1.5% to 9% were obtained. On the contrary a considerable

overestimation was obtained with the most usual classical calibration procedure using 4-n-nonylphenol as internal standard, demonstrating the suitability of the minimal labeling approach.

KEYWORDS: Nonylphenol, Isotope dilution mass spectrometry, Minimal labeling, Isotope pattern deconvolution, LC-MS/MS, Wastewater analysis

1. INTRODUCTION

Nonylphenols (NPs) are degradation products of non-ionic surfactants, NP polyethoxylates, which have been widely used in the production of detergents, plastics, textiles, paper and agricultural chemical products. Since they are able to mimic the structure of the natural hormone 17β -estradiol, which confers on them endocrine disrupting capabilities [1], NPs have been included in the list of priority substances in the Water Framework Directive (WFD) [2] and in the Directive of Environmental Quality Standards(EQSD) [3]. The new proposal for a Directive amending the WFD and EQSD (COM(2011)876) [4] legislates the mixture of isomers nonylphenol (CAS 25154-52-3) including isomers 4-nonylphenol (linear) (CAS 104-40-5) and 4-nonylphenol (branched) (CAS 84852-15-3). Nevertheless, as far as we know the linear isomer has not been detected in water samples at significant concentrations and its estrogenic power is lower than in branched isomers [5]. Therefore, the evaluation of the harmful effects of NPs is focused on the determination of technical NP (NP), consisting mainly in a mixture of branched para-isomers (>90%) [5, 6].

Due to the ubiquitous presence of NP [1, 7] and the low levels required to assess the EQS for these compounds in a great variety of complicated matrices, the development of adequate analytical methods to determine NP is still a challenge [5, 6, 8, 9].

Both GC-MS [6, 8–10] equipped with a single quadrupole and LC-MS [11] with single quadrupole or LC-MS/MS [5, 7–9, 12–14] with a triple quadrupole (QqQ) have been widely used to quantify NP in environmental samples. Nevertheless, LC techniques are preferred over GC-MS because there is no need to perform any derivatization step, which increases the total analysis time and may show low yields in complex matrices [10]. On the other hand, in UHPLC-MS/MS the overall NP isomers elute as a single chromatographic peak, making possible the simultaneous quantification of NP with the same fragmentation pathway. Normally, an off-line preconcentration step by solid-phase extraction (SPE) is required to allow the determination of NP at the levels established in the legislation.

Nowadays there is still no consensus in the selection of a NP isomer which represents both the estrogenic power and the composition of NP in nature. Due to the complexity of the vast majority of environmental samples, the use of an internal standard (IS) during NP determination is almost mandatory. This selected IS should show the same behavior than NP, regarding sample treatment and instrumental measurement [5]. As far as we know, with the exception of Rabouan et al [5], all published papers have used some commercial technical mixture as quantification standard. On the other hand several internal standards have been employed. In GC/MS, isomers $^{13}\text{C}_6$ -363-NP (4-(3,6-Dimethyl-3-heptyl)phenol-ring- $^{13}\text{C}_6$) [6] and 4-sec-NP(4-(2,6-dimethylhept-3-yl)phenol)[10] have been used and each one was compared with the linear isomer 4-n-NP, other usual internal standard. Both papers consider the linear isomer unsuitable due to the different behavior during SPE step [6] or to the different derivatization yield [10] compared to branched NP. Regarding LC-MS (or MS/MS), 4-n-NP- d_8 has been used satisfactorily by Loos et al [7, 12] although in older works [14] it has been considered as unsuitable due to low purity of the standard. Another deuterated isomer, 4-n-NP- d_4 , has been also employed as surrogate [13]. Ferguson et al. [11] discuss the potential limitations of the method using the isomer $^{13}\text{C}_6$ -4-n-NP as surrogate and 4-n-NP as internal standard. They conclude that the linear internal standard

accounts for the matrix effect in the surrogate correctly since both isomers coelute. However, the branched NP elutes at different retention time, probably together with different matrix, and hence the quantification is approximate.

The use of an appropriated internal standard with identical retention time than the analyte might provide the true concentration of NP in complex matrix water samples. In this sense, according to González-Antuña et al. [15, 16] a minimal labeling (e.g. a single ^{13}C label in the molecule) ensures the same physicochemical behavior between the analyte and the isotopically labeled internal standard. The problem associated with this choice is the non-linear isotope dilution calibration graphs owing to the spectral overlap. Nevertheless it can be overcome using Isotope Pattern Deconvolution (IPD).

IPD permits the calculation of the molar fraction of natural and labeled compound in the spiked sample by multiple linear regression using the whole or a part of the mass isotopomer distribution [17]. In addition, this alternative approach does not require any methodological calibration graph, so the total analysis time is drastically reduced. Recently, IPD has been adapted to the determination of diclofenac by UHPLC-MS/MS, demonstrating its applicability to tandem mass spectrometry [18].

In this work, we propose a procedure based on minimal labeling and IPD for the determination of NP in water samples by SPE-UHPLC-MS/MS. For this purpose, the labeled branched isomer $^{13}\text{C}_1$ -4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol ($^{13}\text{C}_1$ -363-NP) has been synthesized in our laboratory and characterized in terms of isotope composition and concentration. Furthermore, possible matrix effect has been corrected since labeled NP surrogate, enriched in a single carbon atom, coelutes with NP. The method has been validated in bottled water, effluent wastewater and influent wastewater spiked at two concentration levels. Finally, the figures of merit provided by the developed methodology were compared with those obtained by the usual external calibration using 4-n-NP as internal standard.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents and materials

The technical 4-nonylphenol mixture (NP) of chain isomers (no. 290858) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and 4-n-nonylphenol (4-n-NP) were delivered by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Stock solutions were prepared by dissolving the corresponding standards in dichloromethane. All stock solutions were stored at -20 °C and employed to prepare daily gravimetrically diluted working standard solutions in methanol. Methanol, acetonitrile and dichloromethane solvents (analysis grade) as well as formic acid (reagent grade) and ammonium acetate (reagent grade) were provided by Scharlau (Barcelona, Spain). Solid phase extraction (SPE) was performed using C18 cartridges Extrabond of 3 mL volume and 500 mg sorbent which were also provided by Scharlau. The pH of the mobile phase was adjusted approximately to 7 by adding ammonium hydroxide from Fluka (Buchs, Switzerland). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q gradient A10 (Millipore, Bedford, MA, USA). Commercially bottled water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles was employed.

For the synthesis of 4-(3,6-dimethyl-3-heptyl) phenol, boron trifluoride (BF₃) diethyl etherate, n-hexane, 3,6-dimethyl-3-heptanol and phenol were purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). The ¹³C₁-4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol (¹³C₁-NP) was synthesized using ¹³C₁-phenol from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

2.2 Synthesis of ¹³C₁-nonylphenol

The synthesis of ¹³C₁-4(3,6-dimethyl-3-heptyl)-phenol (or ¹³C₁-363 NP) was based on a Friedel–Crafts alkylation of ¹³C₁-labelled phenol and a tertiary nonylalcohol employing BF₃-ether complex as catalyst [19, 20]. The procedure is illustrated in Figure 1. As can be observed, the selected labeling position

corresponds to the carbon linked to the hydroxyl group, which remains in the main fragment ions measured by tandem mass spectrometry.

Experimental procedure for the preparation of $^{13}\text{C}_1$ -4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)-phenol: To a stirred solution of $^{13}\text{C}_1$ -labelled phenol (125 mg, 1.31 mmol) and 3,6-dimethyl-3-heptanol (126.5 mg, 0.88 mmol) in hexanes (50 mL) was added boron trifluoride etherate (156 μL , 0.9 mmol). The resulting mixture was stirred overnight, then ice-water (50 mL) was added and extracted with hexanes (3 x 30 mL). The organic layers were dried (sodium sulfate), filtered and concentrated under vacuum to afford a crude oily product which was purified through liquid chromatography (silica-gel, hexanes: ethyl acetate (15:1)) to afford 140 mg (yield = 72%) and characterized by ^1H NMR and ^{13}C NMR.

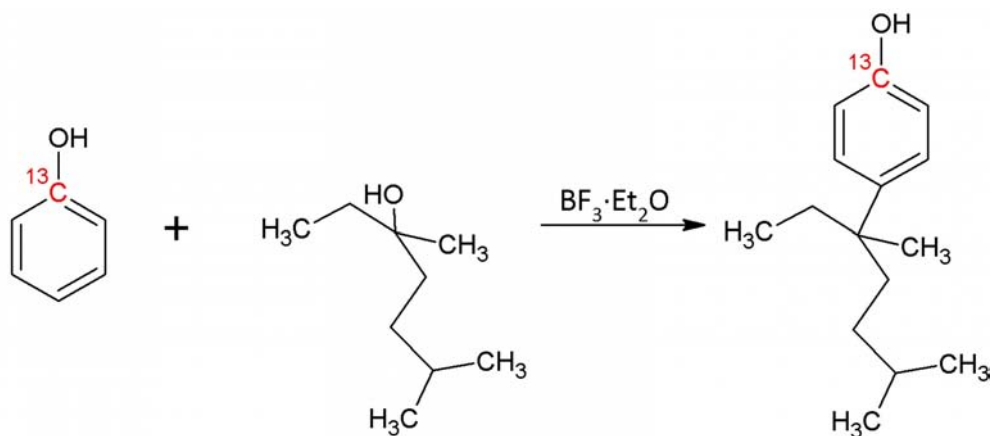


Figure 1. Synthesis pathway of labeled $^{13}\text{C}_1$ -4-(3,6-Dimethyl-3-heptyl)-phenol($^{13}\text{C}_1$ -NP).

Spectroscopic data of $^{13}\text{C}_1$ -4(3,6-dimethyl-3-heptyl)-phenol: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 7.16 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 7.14 (1H, d, $J = 9.1$ Hz), 6.81 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.80 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 5.40 (1H, br s), 1.74-1.64 (2H, m), 1.59-1.39 (m, 3H), 1.24 (3H, s), 1.08-1.01 (1H, m), 0.92-0.85 (1H, m), 0.85 (6H, t, $J = 6.9$ Hz), 0.69 (3H, t, $J = 7.5$ Hz) ppm; ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 152.8, 140.3 (d, $J = 8.2$ Hz), 127.6, 114.8 (d, $J = 66.2$ Hz), 40.6, 40.3, 35.7, 33.2, 28.7, 23.6, 22.7, 8.7 ppm.

Purity was evaluated by GC-EI-MS (see Figure 2). Since only one peak was obtained, the content of $^{13}\text{C}_1$ -nonylphenol was established as higher than 99.9%. The mass spectra of the $^{13}\text{C}_1$ -nonylphenol and the analogous natural analogue are also included in Figure 2. As can be observed, the main fragment ions corresponding to the labelled compound are shifted by one mass unit.

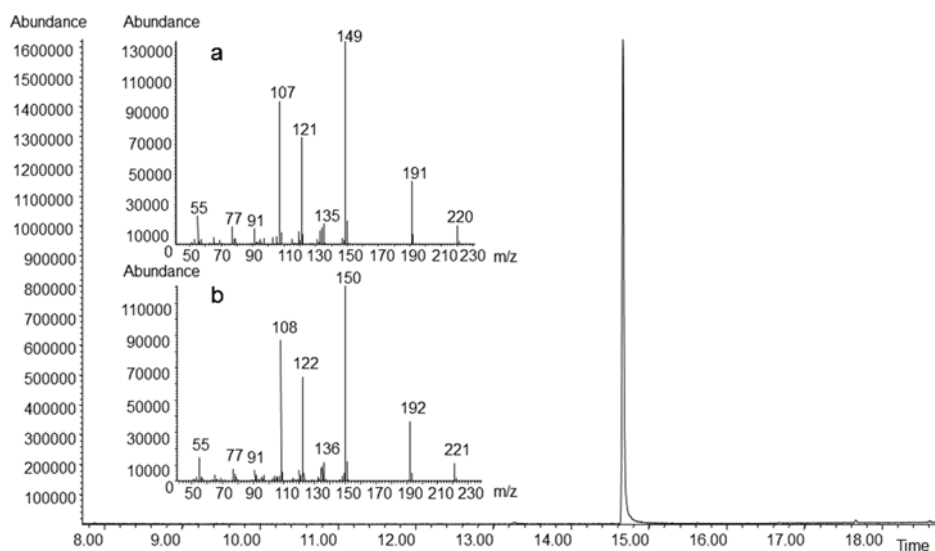


Figure 2. GC-EI-MS chromatogram of $^{13}\text{C}_1$ -4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol and mass spectra of a standard of **a** 4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol and **b** $^{13}\text{C}_1$ -4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol ($^{13}\text{C}_1$ - NP).

2.3 Instrumentation

Identification and quantification of analytes were carried out using an Acquity UPLC system (Waters Corp., Milford, MA, USA), equipped with a binary solvent manager and sample manager. An Acquity UPLC HSS T3 column 1.8 μm , 2.1 mm x 100 mm (i.d.) (Waters) was used. The column oven was set at 40 $^{\circ}\text{C}$, the flow rate was 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ and the injection volume was 20 μL . The separation was performed under isocratic conditions with a mobile phase consisted of 95% methanol/bottled water with 0.01% ammonia and 0.1 mM ammonium acetate.

A TQD (quadrupole-hexapole-quadrupole) tandem mass spectrometer with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (Waters) was used for UHPLC analysis. The mass spectrometer was operated in negative mode electrospray ionization in selected reaction monitoring (SRM) mode. Drying as well as nebulising gas was nitrogen, obtained from a nitrogen generator N_2 LC-MS adapted for LC-MS analysers (Claind, Teknokroma, Barcelona, Spain). The operating parameters of the spectrometer were capillary voltage 3.30 kV, and source and desolvation temperatures 120 and 350 $^{\circ}\text{C}$, respectively. The cone gas and desolvation flow were set at 40 and 400 L/h. For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Praxair, Madrid, Spain) with a pressure of approximately $4 \cdot 10^{-3}$ mbar in the collision cell. Dwell times of 0.1 s/scan were chosen. Masslynx v 4.1 (Waters, Manchester, UK) software was used to process the quantitative data obtained.

Gas chromatography analyses were performed using an Agilent 6890 Series GC equipped with a split-splitless injection port, and mass spectrometric detector (Agilent 5973 N MSD) with an electron ionization (EI) source and MPS2 autosampler from Gerstel (Linthicum, MD, USA). The GC was fitted with a 30 m x 0.25-mm (i.d.), 0.25- μm DB-5MS column (Hewlett-Packard). The column temperature was initially held at 60 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min, and then a temperature ramp of 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ was applied until 300 $^{\circ}\text{C}$ and this temperature was maintained for 1 min. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1mL/min.

Temperature of the injector was set to 280 °C and a sample volume of 2 µL was injected in splitless mode.

2.4 Extraction of technical NP from water

Before loading the SPE cartridges, all effluent (EWW) and influent (IWW) wastewaters with observable suspended particulate matter were decanted by pouring the water after sedimentation slowly from the sample bottles into clean 1 L glass (Schott-Duran) bottles [12]. IWW samples were diluted five times in bottled water due to their high complexity and organic matter content. C18 cartridges were previously rinsed with 6 mL of acetone and conditioned with 6 mL of methanol and 6 mL of bottled water. 200 mL of water were spiked with an appropriate amount of the ¹³C₁-NP, according to the random error propagation theory [21]. Accurate and precise results will be obtained when the ratio of concentrations between the natural and labeled compound is in the range of 0.1 to 10. To prevent volumetric errors, the amount of sample and spike added were determined gravimetrically. Then, the sample was passed through the cartridge by gravity (flow around 3 mL/min). After drying for 30 min, analytes were eluted with 5 mL of methanol. Finally, the extract was evaporated to a volume of around 0.5 mL with a gentle stream of nitrogen (40 °C) in a water bath.

2.5 Reduction of blank contamination

One of the main challenges in the determination of nonylphenol is having under control all the possible contamination sources [22]. The amount of NP coming from all the possible contamination sources of the developed method has been minimized and subtracted to the total measured NP concentration. The main contribution of the sought compound was from Milli-Q water, LC septa and SPE cartridges. Actually, due to the noticeable levels detected in Milli-Q water, bottled water stored in PET bottles has been employed as a sample blank. The selection of appropriate LC septa is also critical, since most PTFE/Silicone septa in LC vials filled with the methanolic extract of sample

releases NP. To prevent any possible contamination LC vials and screw caps were rinsed with methanol. On the other hand, SPE cartridges were rinsed with acetone and dried before use.

Finally, according to the cleaning procedure of Chen et al. [23], glassware was washed with tap water, sonicated with Milli-Q water and then rinsed with acetone, dichloromethane and methanol. Plastic material (e.g. SPE adapters) were washed with tap water and rinsed with acetone and methanol.

After applying all the cleaning procedure, reagent blanks obtained were within the range of 10-30 pg/g.

2.6 Determination of technical NP by Isotope Pattern Deconvolution

For the quantification of NP three transitions were employed: 219 > 133, 220 > 134 and 221 > 135. The molar fractions (X_{nat} and X_{lab}) of natural abundance and labeled NP were calculated by multiple linear regression using the following system of equations:

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{219 > 133} \\ A_{mix}^{220 > 134} \\ A_{mix}^{221 > 135} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{219 > 133} & A_{lab}^{219 > 133} \\ A_{nat}^{220 > 134} & A_{lab}^{220 > 134} \\ A_{nat}^{221 > 135} & A_{lab}^{221 > 135} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{219 > 133} \\ e^{220 > 134} \\ e^{221 > 135} \end{bmatrix} \quad (1)$$

where the $A_{mix}^{i > j}$ values corresponds to the measured relative abundance of the compound in the mixture for the SRM transition of nominal masses $i > j$ and the $A_{nat}^{i > j}$ and $A_{lab}^{i > j}$ values the theoretically calculated or experimentally measured abundances for the natural NP and labeled $^{13}\text{C}_1$ - NP, respectively. The amount (mols) of natural abundance NP in the sample, N_{nat} , is then calculated using equation (2) where the amount (mols) of labeled NP added, N_{lab} , must be known.

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{X_{nat}}{X_{lab}} \quad (2)$$

Confirmation of positive findings was carried out by calculating the peak area ratios between the quantification transition (Q) 219 > 133 and the confirmation transition (q) 219 > 147, and comparing them with ion-ratios from a reference standard.

3. RESULTS AND DISCUSSION

As it was reported in a previous work [18], the application of IPD to tandem mass spectrometry (QqQ) in Selected Reaction Monitoring (SRM) mode requires the calculation of the product ions mass isotopomer distribution of natural abundance and isotope-labeled compound. For the quantification of NP the neutral loss of a C₆H₁₄ group in the molecule was selected [9]. The resulting mass isotopomer distribution coming from each isotope pattern were computed using the software *Isopatrn* implemented by L. Ramaley et al. [24]. Then, molar balances for all these transitions were established as a function of each compound. The procedure is illustrated in Figure 3, where the measured isotope pattern of the spiked sample is deconvoluted into its constituting components by multiple least squares, providing the molar fraction of NP (X_{nat}) and ¹³C₁-NP (X_{lab}).

3.1 Study of the spectral purity and isotope enrichment of ¹³C₁-nonylphenol

The accuracy of the IPD procedure relies on the correct value of the relative abundances employed for NP and ¹³C₁-NP. In tandem mass spectrometry different fragmentation pathways can take place simultaneously, leading to different product ions.

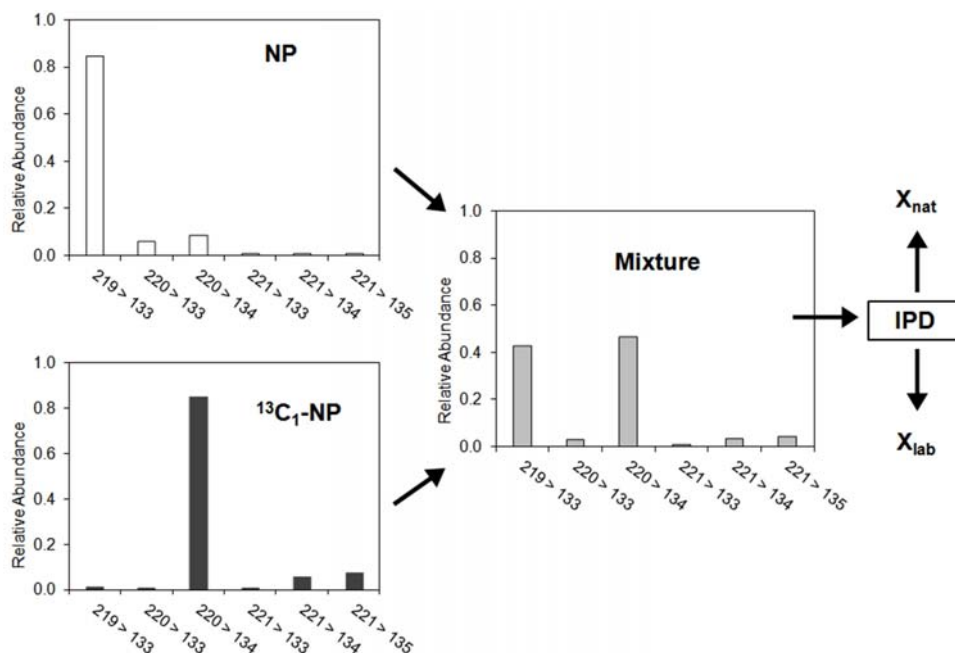


Figure 3. Illustration of the IPD process for a mixture containing an equimolar amount of nonylphenol (NP) and $^{13}\text{C}_1$ -nonylphenol ($^{13}\text{C}_1$ - NP).

The overlapping of the selected fragmentation cluster with any adjacent cluster ion (with one extra hydrogen or one hydrogen less) [15] modifies the isotopomer distribution of each isotope pattern, thus it has to be taken into account. In order to quantify the contribution of each individual source to the overall selected cluster, a complete cluster characterization was performed before isotope dilution analysis using multiple linear regression [15, 25]. A standard solution of around 500 ng/g of NP in methanol was injected 10 times to the UHPLC-MS/MS in SRM mode, including all transitions corresponding to the fragment clusters $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{14}]^-$, $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{15}]^-$ and $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{13}]^-$. The results showed a contribution of 96.0 ± 0.3 for $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{14}]^-$ and $4.0 \pm 0.3\%$ for $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{15}]^-$ cluster. Additionally, spectral purity was evaluated in bottled water, surface water and effluent and influent wastewater. As it can be seen in Table

1, the fragmentation factors did not change with the matrix of the sample. Consequently, the theoretical isotopomer distribution of the natural abundance nonylphenol was recalculated to include the [M-H-C₆H₁₅]⁻ contribution.

For the calculation of the isotopomer distribution of ¹³C₁-NP, the extent of labeling must be determined previously. To this end, standard solutions containing 500 ng/g of ¹³C₁-NP were injected in the UHPLC-MS/MS system (n=5). The measured cluster abundances were compared with those calculated for theoretical enrichments of the labeled compound from 96.5 to 99.5% ¹³C₁. It is worth stressing that the fragmentation pattern is independent of the isotope composition of the molecule (natural or labeled), thus the theoretical cluster abundances of ¹³C₁-NP were also recalculated including the [M-H-C₆H₁₅]⁻ contribution. Since the lower the sum of squares of errors, the more similar the mass isotopomer distribution examined, the computation of such errors allowed us to find the ¹³C₁ enrichment of the molecule. A clear minimum was obtained for around 98 atom % ¹³C₁ for all the replicates (see Figure 4). Accordingly, the theoretical isotopomer distribution of the labeled compound was calculated assuming a ¹³C₁ enrichment of 98%.

Table 1. Contribution of the main theoretical pure clusters to the final measured cluster in different water samples for NP

Fragment ion	Relative abundances (%)			
	Bottled water	Surface water	Effluent wastewater	Influent wastewater
[M-H-C ₆ H ₁₄] ⁻	96.1 ± 0.4 ^a	96.2 ± 0.4	95.4 ± 0.4	95.5 ± 0.4
[M-H-C ₆ H ₁₅] ⁻	3.9 ± 0.4	3.8 ± 0.4	4.6 ± 0.4	4.5 ± 0.4

^a The standard uncertainty of the results corresponds to two UHPLC-MS/MS injections.

Once obtained the whole isotope distribution of NP and $^{13}\text{C}_1\text{-NP}$, the IPD approach can be applied. The resulting overdetermined system of equations can be expressed, in matrix form, as

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{219 > 133} \\ A_{mix}^{220 > 133} \\ A_{mix}^{220 > 134} \\ A_{mix}^{221 > 133} \\ A_{mix}^{221 > 134} \\ A_{mix}^{221 > 135} \\ A_{mix}^{222 > 133} \\ A_{mix}^{222 > 134} \\ A_{mix}^{222 > 135} \\ A_{mix}^{222 > 136} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0.81280 & 0.01643 \\ 0.05740 & 0.03470 \\ 0.08027 & 0.80661 \\ 0.00173 & 0.00227 \\ 0.00555 & 0.05659 \\ 0.00521 & 0.07090 \\ 0.00003 & 0.00006 \\ 0.00016 & 0.00170 \\ 0.00036 & 0.00490 \\ 0.00026 & 0.00440 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{219 > 133} \\ e^{220 > 133} \\ e^{220 > 134} \\ e^{221 > 133} \\ e^{221 > 134} \\ e^{221 > 135} \\ e^{222 > 133} \\ e^{222 > 134} \\ e^{222 > 135} \\ e^{222 > 136} \end{bmatrix} \quad (3)$$

The $A_{mix}^{i > j}$ values corresponds to the measured relative abundance of the compound in the mixture for the SRM transition of nominal masses $i > j$. These values are determined experimentally by peak area integration of several product ions. The relative abundance of each fragment is then calculated dividing the peak area of a given SRM transition by the sum of all areas. As we have more parameters (transitions) than unknowns (molar fractions) an error vector is included in eqn (3). The best values of X_{nat} and X_{lab} are found by least square minimization of the error vector 'e'.

Finally, only three SRM transitions were selected (219 > 133, 220 > 134 and 221 > 135), according to the random error propagation theory, to make possible the application of this alternative technique in routine multi-residue analysis.

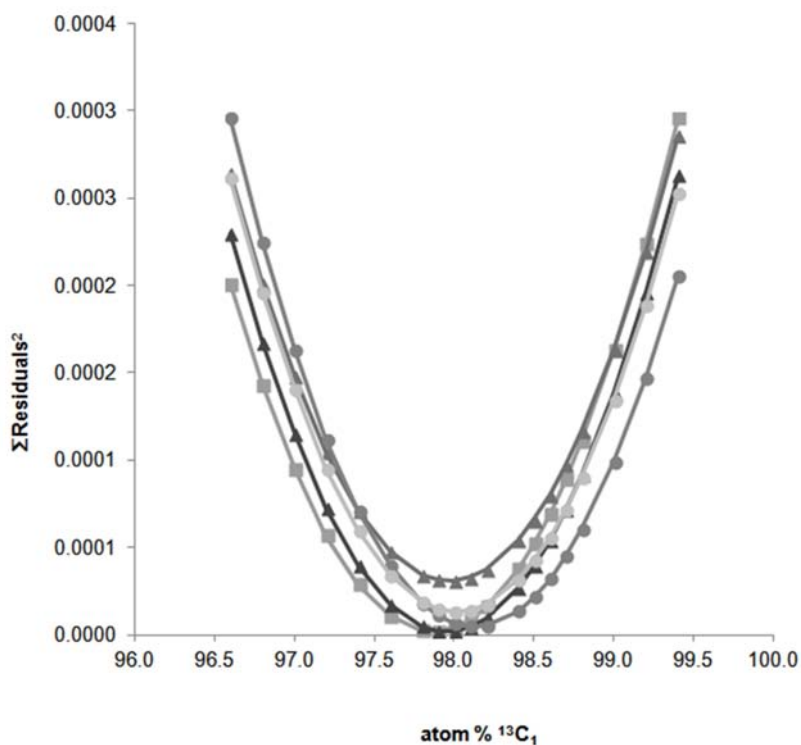


Figure 4. Calculation of the ^{13}C enrichment for a standard solution containing 500 ng/g of $^{13}\text{C}_1$ -nonylphenol ($^{13}\text{C}_1$ - NP).

3.2 Optimization of chromatographic conditions

In order to achieve the elution of NP as well as 4-n-NP different mobile phases based on methanol or acetonitrile and water were tested. The addition of different modifiers such as ammonia, ammonium acetate and formic acid were also evaluated.

The use of gradient conditions led to inappropriate higher areas due to the trace nonylphenol contamination of Milli-Q water, which is accumulated at the head of the column. As a consequence, isocratic conditions were employed. Regarding mobile phase composition, higher sensitivity was observed when

the analyte was eluted with methanol instead of acetonitrile. The addition of ammonia as a modifier also increased the signal of the analyte while formic acid decreased it. We also observed that combination of ammonium acetate with ammonia did not decrease significantly the signal but stabilized it. According to this, a mobile phase consisted in 95:5 methanol:water containing 0.01% ammonia and 0.1mM ammonium acetate was selected. In this conditions the compounds were eluted in a 3-minutes run without the need of column stabilization between injections. Finally, we reduced the background associated to blank contamination using bottled water instead of Milli-Q water.

3.3 Solid-phase extraction

To reach the sensitivity necessary to detect the typical concentrations of NP present in environmental samples an off-line pre-concentration step was included. For this purpose, bottled water was spiked with NP at two concentration levels; namely, 0.1 ng/g and 1 ng/g.

In spite of some authors reject the use of any plastic material during the analytical procedure [22] SPE was selected because it is a simple and rapid isolation technique widely used in routine laboratories. The use of Oasis HLB cartridges was rejected due to the low recoveries described in literature [26, 27] associated to the high hydrophobicity of NP. Following literature recommendations [26], samples were passed through C18 cartridges. The elution solvents tested were acetonitrile and methanol. Although no relevant differences were noticed, the mobile phase is based on the last one; so, methanol was selected for elution (5 mL).

Once the type of cartridge and elution solvent were selected, different sample volumes were evaluated. It was observed that 100 mL of water spiked at the low concentration tested were not enough to confirm the presence of nonylphenol, i.e. the peak area corresponding to the transition 219 > 147 was too low. Therefore, the sample volume was increased up to 200 mL, which did not exceed the breakthrough volume. In these conditions, the SPE recoveries

were around 70 %. In any case, the use of $^{13}\text{C}_1\text{-NP}$ as surrogate allowed us to obtain satisfactory recoveries (see next section).

3.4 Method validation

Analytical characteristics of the developed method were evaluated in three types of water samples (bottled, EWW and IWW). Accuracy and precision were estimated from recovery experiments of the target compound at two concentration levels, analyzing three independent replicates injected three times each. Bottled samples and EWW were spiked at 0.1 and 1 ng/g of NP, while IWW was spiked at 1 and 10 ng/g because of its higher endogenous nonylphenol concentration. Afterwards, the synthesized labeled compound $^{13}\text{C}_1\text{-NP}$ was added at the same concentration level as NP. Since it was not possible to obtain a true blank sample, bottled water, EWW and IWW were previously analyzed and the concentrations of the analyte found were subtracted from the spiked samples, resulting in higher errors in the recovery calculation. Figure 5 shows the chromatograms corresponding to the different spiked water samples analyzed at their low validation level. As can be seen, the labeled and natural nonylphenol co-elute, thus there were no chromatographic isotopic effects and recoveries within 83-108% were obtained (Table 2). These values indicate that matrix effect is correctly accounted for.

Precision, expressed as repeatability in terms of relative standard deviation (RSD), was from 1.5 to 9%, which are considerably lower than the maximum required by SANCO guide [28] ($\text{RSD} \leq 20\%$).

The spiked samples were also quantified by classical calibration curve employing 4-n-NP as internal standard. To this end, increasing concentrations (0.05-5 $\mu\text{g/g}$) of NP in methanol containing 0.4 $\mu\text{g/g}$ of 4-n-NP were injected in triplicate through the UHPLC- MS/MS. To build the calibration graph, relative areas were used, selecting the transition (219 > 106) for the linear nonylphenol and (219 > 133) for NP. We spiked samples at 1ng/g of 4-n-NP and extracted them as described previously. As can be seen in Table 2, a clear

overestimation was observed when using such internal standard, especially in effluent wastewater. Due to the fact that 4-n- NP elutes at different retention time than NP it cannot mimic the behavior of the analyte, especially in complicated sample matrix such as effluent wastewater in which no sample dilution was performed. Contrary to previous publications [14], we observed that in this case linear nonylphenol was not well suited as internal standard.

In the line of European Commission Decision 2002/657/EC [29], the confirmation of the positive findings were carried out by calculating the peak area ratio between the most intense transition (219 > 133) and the confirmation transition (219 > 147).

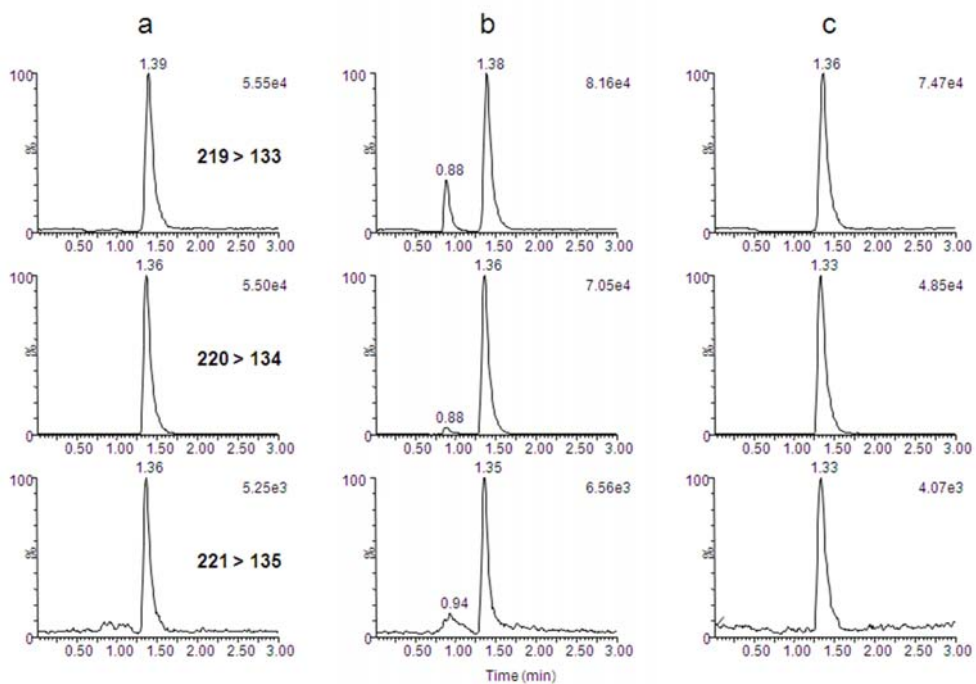


Figure 5. Chromatograms in negative electrospray ionization for technical nonylphenol in; (a) bottled water at 0.1 ng/g, (b) effluent waste water 0.1 ng/g, and (c) influent waste water at 1 ng/g.

In spite of the theoretical contribution of $^{13}\text{C}_1\text{-NP}$ to these transitions, this was low enough to not to induce false positives, making possible the appropriate confirmation of the samples.

Finally, the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were estimated for $S/N = 3$ and $S/N = 10$, respectively, from the chromatogram of the lowest concentration level tested. The values obtained are shown in Table 3 and were similar to other conventional methods proposed for the determination of NP [14, 26, 30]. In the line of the new proposal for a Water Framework Directive, the annual average value for technical nonylphenol in waters is $0.3 \mu\text{g/L}$, whereas the maximum acceptable concentration (MAC-EQS) is $2 \mu\text{g/L}$. Thus the developed procedure could be very useful to carry out a fast determination of NP at the levels established by the legislation.

Table 2. Recovery of technical nonylphenol in bottled water and effluent and influent waste water obtained by minimal labeling and by a classical calibration curve.

Sample	Validation level (ng/g)	Recovery (%)	
		Minimal labeling and IPD	Classical calibration procedure
Bottled Water	0.1	97 ± 9^a	165 ± 8
	1	104 ± 5	123 ± 18
Effluent Wastewater	0.1	83 ± 5	385 ± 55
	1	106.0 ± 1.8	596 ± 20
Influent Wastewater	1	107 ± 8	157 ± 41
	10	108.0 ± 1.5	151 ± 55

^aThe uncertainty of the values corresponds to 1s standard deviation of three independent replicates injected three times each.

Table 3. Limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) and blank values in the three matrices studied.

Sample	Limit of Detection (pg/g)	Limit of Quantification (pg/g)	Blank value (pg/g)
Bottled water	9	29	18.1 ± 0.6 ^a
Effluent Wastewater	6	21	102.6 ± 2.4
Influent Wastewater	86	290	801 ± 21

^aBlank values correspond to one replicate injected three times

4. CONCLUSIONS

An UHPLC-MS/MS method for the determination of NP in wastewater samples has been developed and validated. The selected quantification procedure is based on isotope dilution mass spectrometry and isotope pattern deconvolution which provides reliable and fast results. Each sample is spiked with a minimal labeled internal standard, separated in the UHPLC-MS/MS system and quantified without the need to resort to any methodological calibration graph. The labeled branched isomer ¹³C₁-4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol has been synthesized and used as surrogate. Since this compound is enriched in a single carbon atom it shows identical physicochemical properties than the technical NP mixture assayed and therefore the same retention time. Thus, it provides a suitable matrix effect correction in ESI ionization source. The validated method is robust and sensitive, even in influent wastewater. High accuracy (recovery near 100%) and precision (CV below 10%) are obtained which confer on the procedure high reliability for the determination of NP at the EU legislation requirements. On the contrary, when quantifying with the most usual classical calibration procedure with 4-n-NP as internal standard important overestimation was observed, especially in effluent wastewater.

Future works will be in line with the synthesis of new single ^{13}C labeled standards for the development of multiresidue methods with the inclusion of other legislated alkylphenols combining IPD calculations. Moreover, alternative extraction methods able to be used in routine laboratories should be investigated to reduce the time associated to the off-line preconcentration step by SPE.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the financial support from Generalitat Valenciana (Research group of excellence Prometeo 2009/054). N.Fabregat-Cabello also acknowledges the Generalitat Valenciana for her Ph.D. research grant under the Program VALi+D. We would like to thank S.Ballester and J.L. Aranda (IPROMA) for their useful comments and help. Finally the authors are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using Acquity and TQD instruments.

REFERENCES

- [1] A. Soares, B. Guieysse, B. Jefferson, E. Cartmell, J.N. Lester, *Environ. Int.*, 34 (2008) 1033–1049.
- [2] *Directive 2000/60/EC, Establishment and Framework for Community Action in the Field of Water Policy, European Parliament and the Council of the European Union*, 2000.
- [3] *Directive 2008/105/EC, Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy, Amending and Subsequently Repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and Amending Directive 2000/60/EC, European Parliament a*, 2008.
- [4] *Proposal for a Directive of the european parliament and of the council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy (COM(2011)876)*, 2012.
- [5] S. Rabouan, A. Dupuis, A. Cariot, M. Albouy-Llaty, V. Migeot, B. Legube, *Trend. Anal. Chem.*, 37 (2012) 112–123.
- [6] E. Stottmeister, O.P. Heemken, P. Hendel, G. Donnevert, S. Frey, H. Allmendinger, G. Sawal, B. Jandel, S. Geiss, R. Donau, A. Koch, I. Heinz, M. Ottaviani, E. Veschetti, W. Hartl, C. Kubwabo, C. Benthe, V. Tobinski, H. Woldmann, R. Spilker, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 6765–6773.
- [7] R. Loos, B.M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini, G. Bidoglio, *Environ. Pollut.*, 157 (2009) 561–568.
- [8] E. Olkowska, Ž. Polkowska, J. Namieśnik, *Talanta*, 88 (2012) 1–13.
- [9] E. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galceran, *Mass. Spectrom. Rev.*, (2010) 776–805.
- [10] A.R. Fischer, N.T.P. Lan, C. Wiedemann, P. Heide, P. Werner, A.W. Schmidt, G. Theumer, H.-J. Knölker, *J. Chromatogr. A.*, 1217 (2010) 2950–2955.
- [11] P.L. Ferguson, C.R. Iden, B.J. Brownawell, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4322–4330.
- [12] R. Loos, G. Locoro, S. Contini, *Water Res.*, 44 (2010) 2325–2335.
- [13] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A.*, 1223 (2012) 1–8.
- [14] R. Loos, G. Hanke, G. Umlauf, S.J. Eisenreich, *Chemosphere*, 66 (2007) 690–699.
- [15] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, *Analyst*, 135 (2010) 953–964.

- [16] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, I. Lavandera, G. Centineo, V. Gotor, J.I. García Alonso, *Anal. Bioanal. Chem.*, 402 (2012) 1879–1888.
- [17] P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 25 (2010) 239.
- [18] Á. Castillo, E. Gracia-Lor, A.F. Roig-Navarro, J.V. Sancho, P. Rodríguez-González, J.I.G. Alonso, *Anal. Chim. Acta* (2013) 77-85.
- [19] R. Vinken, B. Schmidt, A. Schäffer, *J. Labelled Compd. Rad.*, 45 (2002) 1253–1263.
- [20] T. Uchiyama, M. Makino, H. Saito, T. Katase, Y. Fujimoto, *Chemosphere*, 73 (2008) S60–S65.
- [21] J.I. García Alonso, *Anal. Chim. Acta*, 312 (1995) 57–78.
- [22] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *Talanta*, 101 (2012) 413–419.
- [23] W.L. Chen, G.S. Wang, J.C. Gwo, C.Y. Chen, *Talanta*, 89 (2012) 237–245.
- [24] L. Ramaley, L. Cubero Herrera, *Rapid Commun. Mass Sp.*, (2008) 2707–2714.
- [25] J. Meija, J. a Caruso, *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, 15 (2004) 654–658.
- [26] T. Vega-Morales, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *J. Hazard. Mater.*, 183 (2010) 701–711.
- [27] N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, 1152 (2007) 14–31.
- [28] *European Commission, DG-SANCO, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document No. SANCO/12495/2011, Brussels, December, 2011.*
<http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcont>, 2012.
- [29] *European Union Decision 2002/657/EC, Off. J. Eur. Commun.*, L221, 2002, pp. 8-36 (12 August 2002), .
- [30] M. Petrovic, A. Diaz, F. Ventura, D. Barceló, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5886–5895.

3.3 Desarrollo y validación de un método para la cuantificación de alquilfenoles por espectrometría de masas de dilución isotópica

Tal y como se ha reseñado en el apartado anterior, los alquilfenoles son un grupo de disruptores endocrinos que han sido ampliamente utilizados y que, por lo tanto, suponen un riesgo para el medio acuático en su conjunto. En este tercer trabajo, a modo de ampliación y mejora de la metodología de análisis desarrollada en el artículo científico 2, se desarrolló y validó en aguas residuales un método de cuantificación basada en IPD, esta vez incluyendo el 4-t-octilfenol. Para ello, se sintetizó y caracterizó el análogo marcado $^{13}\text{C}_1$ -t-octilfenol, tal y como se verá más adelante en este mismo apartado.

Esta selección de un nuevo compuesto se basó en que el 4-t-octilfenol (o simplemente, OP) es el segundo alquilfenol más utilizado tras el nonilfenol para la fabricación de APEO, alcanzando aproximadamente el 20% de la producción. Ambos alquilfenoles se caracterizan por ser introducidos en el medio acuático en grandes cantidades, aunque el OP suele encontrarse a una concentración un orden de magnitud inferior que el NP¹⁷. Otra diferencia entre ambos compuestos es que la síntesis del t-octilfenol genera un único producto, en contraste con la mezcla técnica de compuestos para-sustituídos generada en el NP. El resto de características son compartidas con el NP y han sido ya descritas anteriormente.

De la misma forma que el nonilfenol, el octilfenol se encuentra regulado dentro de la Directiva Marco del Agua⁵, aunque a un nivel más bajo en aguas superficiales, siendo 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ en vez de 0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$ como ocurría con el NP. Este hecho puede justificarse mediante estudios hematológicos, bioquímicos y hormonales recientes, los cuales demuestran que los efectos individuales del OP son más acusados que los producidos por un mismo nivel de NP¹⁷.

En cuanto al tratamiento de muestra se estudió la aplicación de técnicas conformes con las tendencias actuales de reducción de tiempo de aplicación, de costes y de volumen de disolventes orgánicos que puedan resultar nocivos para el medioambiente. La técnica escogida fue la microextracción en fase líquida (LPME), una miniaturización de la extracción líquido-líquido clásica. De esta técnica, LPME, se esperaba obtener elevados valores de preconcentración en extractos limpios.

Desarrollo experimental

En este trabajo se recurrió de nuevo al acoplamiento UHPLC-MS/MS, adoptando las condiciones cromatográficas del trabajo anterior ya que fueron adecuadas para la introducción de este nuevo compuesto.

Respecto al tratamiento de muestra, como se ha comentado, la principal mejora incluida en el desarrollo de este método se basó en la aplicación de la microextracción en fase líquida con capilares de fibra hueca (HF-LPME, *hollow fiber liquid phase microextraction*).

De forma general, la HF-LPME consiste en una técnica miniaturizada de extracción líquido-líquido en la que la fase aceptora se encuentra impregnando una fibra hueca porosa diseñada en polipropileno. Esta técnica surgió a finales de los años 90¹⁸ como una mejora respecto a las extracciones que empleaban una gota colgante, ya que se incrementaba la reproducibilidad utilizando la fibra a modo de soporte.

El principio básico de la HF-LPME es el paso de los analitos desde una fase acuosa (la muestra) hasta la fase aceptora, formada por tan solo unos pocos microlitros. De esta forma es posible obtener los ya comentados extractos más limpios y factores de preconcentración muy altos. En este trabajo, la configuración seleccionada para la extracción de los alquifenoles, OP y NP, fue

de dos fases, siendo una la fase acuosa de la muestra y la aceptora un disolvente orgánico. La fase aceptora de octanol fue seleccionada a partir de los altos coeficientes de partición octanol-agua para ambos compuestos, siendo el $\log K_{ow}$ cercano a 4. Tras treinta minutos de extracción combinada con agitación, los extractos de octanol sólo tuvieron que ser diluidos en metanol antes de ser introducidos en el sistema de análisis mediante UHPLC-MS/MS. Puede observarse en la Figura 3.4 una imagen con el procedimiento de extracción empleado. También cabe destacar que la introducción de los extractos con una proporción 1:9 octanol/metanol triplicó la señal obtenida para ambos analitos, hecho que facilitó la validación a los niveles seleccionados.

Teniendo en cuenta el tratamiento descrito, la ventaja principal de esta metodología es la reducción del tiempo de análisis, unida además a una significativa reducción del coste por muestra. A modo de ejemplo, evaluando el soporte únicamente, una extracción por HF-LPME cuesta unos pocos céntimos de euros en comparación con los varios euros que cuesta cada cartucho de SPE. Además dicha técnica reduce considerablemente los volúmenes de disolventes orgánicos empleados, consiguiendo así un procedimiento analítico más respetuoso con el medioambiente. También destaca la considerable reducción del tiempo total de tratamiento de muestra necesario en la extracción de HF-LPME frente a la SPE. Así, se pasa de necesitar unas ocho horas por extracción en el caso de la SPE a menos de una hora (30 minutos de extracción más manipulación) en el caso de utilizar fibras. Los distribuidores de vacío habituales disponibles constan de veinticuatro puertos de SPE, mientras que en el caso de las fibras, la restricción de extracciones simultáneas está ligada al número de placas agitadoras disponibles, que en nuestro caso fue nueve.

Finalmente, la metodología desarrollada fue validada mediante la fortificación de ambos compuestos en muestras de agua medioambientales (influyente y efluente de depuradora) y en agua de calidad Milli-Q, a dos niveles de concentración (0.1 y 1 $\mu\text{g/L}$).

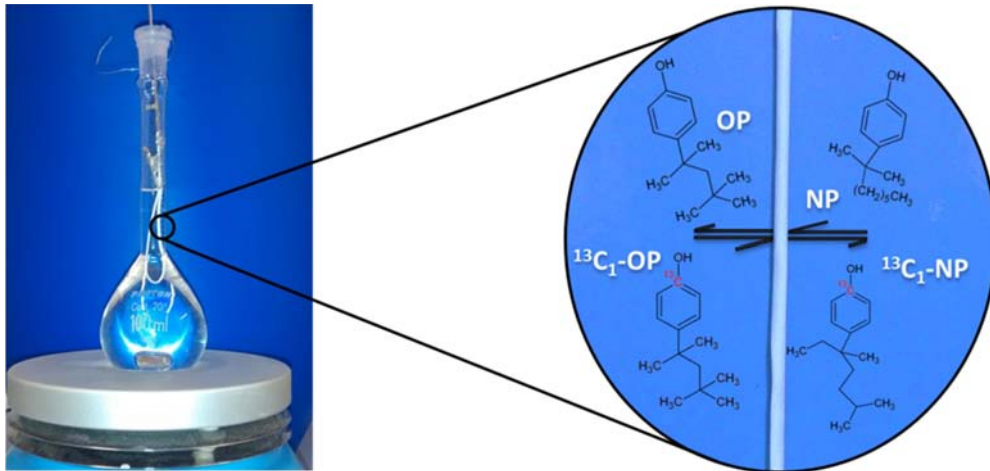


Figura 3.4 Esquema del proceso de microextracción en fase líquida usando fibras huecas.

Síntesis y caracterización del $^{13}\text{C}_1$ -octilfenol

Para el propósito de reducir los posibles efectos isotópicos durante todo el procedimiento analítico, se sintetizó el análogo del OP natural enriquecido con un solo carbono trece. Esta síntesis también se llevó a cabo mediante alquilación del fenol enriquecido isotópicamente con un ^{13}C . Tras su síntesis y purificación, el compuesto fue caracterizado por GC-MS así como por RMN. De forma análoga al NP, la descripción completa de las señales de RMN se encuentra en el artículo científico 3 mientras que el espectro se puede consultar en la Figura 3.5.

Este compuesto fue empleado para la cuantificación mediante IPD del OP de composición natural, así como para la corrección de todos los posibles errores derivados del procedimiento analítico aplicado, incluido el efecto matriz.

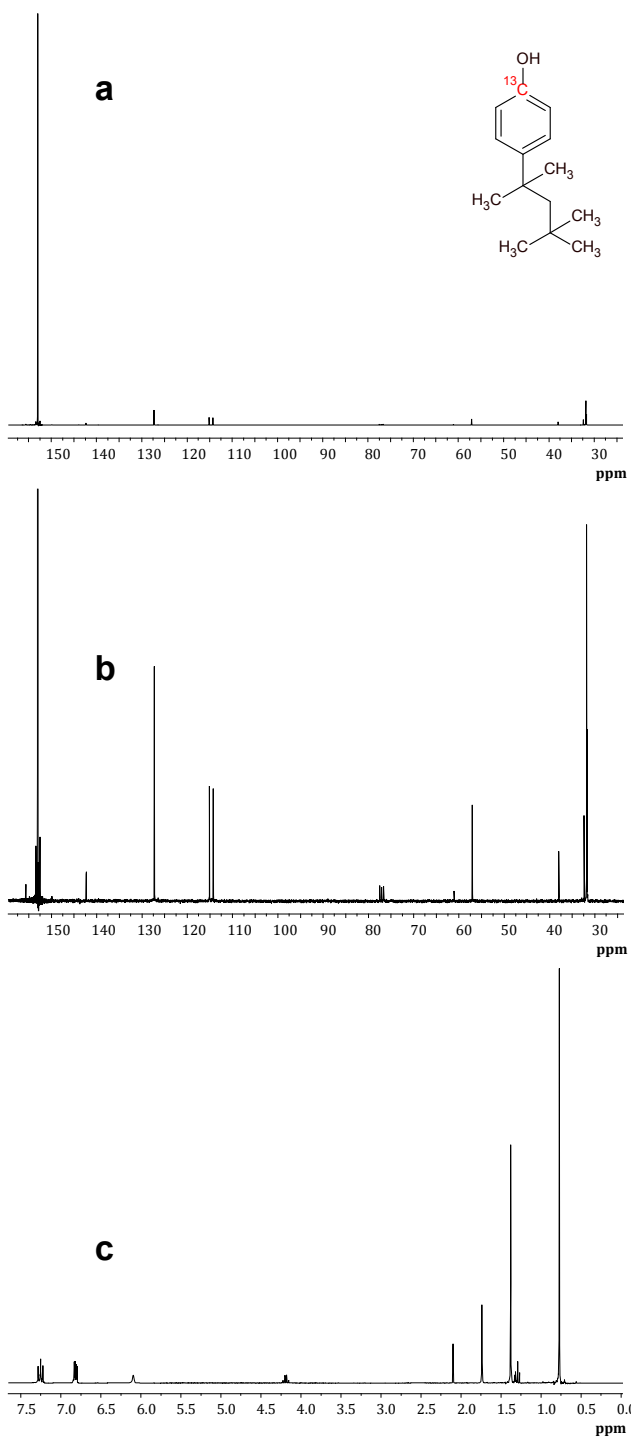


Figura 3.5 Espectros seleccionados de RMN para el ¹³C₁-octilnilfenol: a) carbono-13, b) carbono-13 ampliado y c) protón.

3.3.1 Artículo científico 3

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

Fabregat-Cabello, N., Sancho, J. V., Vidal, A., González, F. V. & Roig-Navarro, A.
F. Journal of Chromatography A 2014, 1328, 43–51.

Journal of Chromatography A, 1328 (2014) 43–51

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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

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

Neus Fabregat-Cabello^a, Juan V. Sancho^a, Andreu Vidal^b, Florenci V. González^b, Antoni Francesc Roig-Navarro^{a,*}

^a Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071 Castellón, Spain
^b Departament de Química Inorgànica i Orgànica, Universitat Jaume I, E-12071 Castellón, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 23 September 2013
 Received in revised form 23 December 2013
 Accepted 24 December 2013
 Available online 4 January 2014

Keywords:
 Alkylphenol
 Hollow fiber liquid phase microextraction
 Isotope dilution mass spectrometry
 Isotope pattern deconvolution
 LC-MS/MS
 Wastewater analysis

ABSTRACT

We present here a new measurement method for the rapid extraction and accurate quantification of technical nonylphenol (NP) and 4-t-octylphenol (OP) in complex matrix water samples by UHPLC-ESI-MS/MS. The extraction of both compounds is achieved in 30 min by means of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) using 1-octanol as acceptor phase, which provides an enrichment (pre-concentration) factor of 800. On the other hand we have developed a quantification method based on isotope dilution mass spectrometry (IDMS) and singly ¹³C₁-labeled compounds. To this end the minimal labeled ¹³C₁-4-(3,5-dimethyl-3-heptyl)-phenol and ¹³C₁-t-octylphenol isomers were synthesized, which coelute with the natural compounds and allows the compensation of the matrix effect. The quantification was carried out by using isotope pattern deconvolution (IPD), which permits to obtain the concentration of both compounds without the need to build any calibration graph, reducing the total analysis time. The combination of both extraction and determination techniques have allowed to validate for the first time a HF-LPME methodology at the required levels by legislation achieving limits of quantification of 0.1 ng mL⁻¹ and recoveries within 97–109%. Due to the low cost of HF-LPME and total time consumption, this methodology is ready for implementation in routine analytical laboratories.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alkylphenols (AP) are chemical compounds that are mainly used to produce alkylphenol ethoxylates (APEs), a class of synthetic surfactants widely used in detergents and cleaning products. Among the AP ethoxylates, the nonylphenol ethoxylates represent an 80% while the remaining 20% are almost entirely octylphenol isomers [1]. After degradation, APEs are released as AP, mainly in the water environment. The main problem associated to AP is their ability to mimic the structure of natural hormones, specifically 17- β -estradiol, which confers on them endocrine disrupting capabilities. The widespread use of AP polyethoxylates coupled with the harmful effects of alkylphenols had led to include them in the list of the priority substances of the Water Framework Directive (WFD) [2] which contain t-octylphenol (OP) and branched nonylphenol (NP), a complex mixture of nonylphenol isomers which is known

as "technical grade nonylphenol". Due to the method sensitivity required in international regulations (i.e. 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for OP and 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ for NP according to EU Environmental Quality Standards, EQS), together with its ubiquitous presence as contaminant, the identification and quantification of AP still presents considerable challenges.

Contrary to the determination of OP, the determination of NP involves a particular analytical challenge because NP comprises a complex mixture of isomers. Since the legislation establishes the EQS for the sum of all forms of branched 4-nonylphenol (CAS 84852-15-3), most laboratories employed commercial technical nonylphenol mixtures as analytical reference standard to quantify NP. In GC-MS their identification is based on the peak pattern (fingerprint) and NP is quantified from the sum of all peaks belonging to the chromatographic pattern [3]. This can be a tedious and non-reproducible work since the analyst should use caution to include only those peaks from the analyte. On the other hand, in LC-MS/MS the overall NP isomers elute as a single chromatographic peak associated to transition 219 > 133. This transition suggests that the α -carbon of the nonylphenols is mainly a tertiary

* Corresponding author. Tel.: +34 964 387 359; fax: +34 964 387 368.
 E-mail address: roig@uji.es (A.F. Roig-Navarro).

Reproduced with permission from: *J. Chromatogr. A*, 2014, 1328, pp 43–51.
 Copyright © 2014 Elsevier B.V. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.12.077>

Development and validation of a Liquid Chromatography Isotope Dilution Mass Spectrometry method for the reliable quantification of alkyphenols in environmental water samples by Isotope Pattern Deconvolution

Journal of Chromatography A, 1328 (2014) 43–51.

Neus Fabregat-Cabello,^a Juan V. Sancho,^a Andreu Vidal,^b Florenci V. González,^b Antoni Francesc Roig-Navarro.^{a,*}

^aResearch Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071, Castellón, Spain.

^bDepartament de Química Inorgànica i Orgànica, Universitat Jaume I, E-12071, Castellón, Spain

ABSTRACT

We present here a new measurement method for the rapid extraction and accurate quantification of technical nonylphenol (NP) and 4-t-octylphenol (OP) in complex matrix water samples by UHPLC-ESI-MS/MS. The extraction of both compounds is achieved in 30 min by means of hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) using 1-octanol as acceptor phase, which provides an enrichment (preconcentration) factor of 800. On the other hand we have developed a quantification method based on Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) and singly ¹³C₁-labeled compounds. To this end the minimal labeled ¹³C₁-4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)-phenol and ¹³C₁-t-octylphenol isomers were synthesized, which coelute with the natural compounds and allows the compensation of the matrix effect. The quantification was carried out by using isotope pattern deconvolution (IPD), which permits to obtain the concentration of both compounds without the need to build any calibration graph, reducing the total analysis time. The combination of both extraction and determination techniques have allowed to validate for the first time a HF-LPME methodology at the required levels by legislation achieving limits of

quantification of 0.1 ng/mL and recoveries within 97-109%. Due to the low cost of HF-LPME and total time consumption, this methodology is ready for implementation in routine analytical laboratories.

KEYWORDS: Alkylphenol, Hollow fiber liquid phase microextraction, Isotope dilution mass spectrometry, Isotope pattern deconvolution, LC-MS/MS, Wastewater analysis

1. INTRODUCTION

Alkylphenols (AP) are chemical compounds that are mainly used to produce alkylphenol ethoxylates (APEs), a class of synthetic surfactants widely used in detergents and cleaning products. Among the AP ethoxylates, the nonylphenol ethoxylates represent a 80 % while the remaining 20% are almost entirely octylphenol isomers [1]. After degradation, APEs are released as AP, mainly in the water environment. The main problem associated to AP is their ability to mimic the structure of natural hormones, specifically 17- β -estradiol, which confers on them endocrine disrupting capabilities. The widespread use of AP polyethoxylates coupled with the harmful effects of alkylphenols had led to include them in the list of the priority substances of the Water Framework Directive (WFD) [2] which contain t-octylphenol (OP) and branched nonylphenol (NP), a complex mixture of nonylphenol isomers which is known as “technical grade nonylphenol”. Due to the method sensitivity required in international regulations (i.e. 0.1 $\mu\text{g/L}$ for OP and 0.3 $\mu\text{g/L}$ for NP according to EU Environmental Quality Standards, EQS), together with its ubiquitous presence as contaminant, the identification and quantification of AP still presents considerable challenges.

Contrary to the determination of OP, the determination of NP involves a particular analytical challenge because NP comprises a complex mixture of isomers. Since the legislation establishes the EQS for the sum of all forms of branched 4-nonylphenol (CAS 84852-15-3), most laboratories employed

commercial technical nonylphenol mixtures as analytical reference standard to quantify NP. In GC-MS their identification is based on the peak pattern (fingerprint) and NP is quantified from the sum of all peaks belonging to the chromatographic pattern [3]. This can be a tedious and non-reproducible work since the analyst should use caution to include only those peaks from the analyte. On the other hand, in LC-MS/MS the overall NP isomers elute as a single chromatographic peak associated to transition 219>133. This transition suggests that the α -carbon of the nonylphenols is mainly a tertiary carbon [4]. Nevertheless, we always have to take into account that a complete separation is the only real way to assess both different disrupting capabilities and sensitivity in the MS detector for the different nonylphenol isomers. However, NP isomers can only be completely separated by GCXGC [4] which is not a feasible option in most routine laboratories. Moreover, neither all the chromatographic peaks are identified nor commercial standards exist for all possible isomers. Taking these reasons into account, a recent work of Rabouan et al. [5] proposes the isomer 353-NP ((3,5-dimethylheptan-3-yl)phenol) as a reference material representative of both, instrumental sensitivity and toxicity of NP.

In order to achieve the low quantification levels established by the EQS a preconcentration step before the determination of alkylphenols in water samples is mandatory. The most employed methodologies in AP determination include liquid-liquid extraction (LLE) or solid phase extraction (SPE) [6]. These methodologies are usually time-consuming and require the use of large solvent volumes. Nowadays there is an increasing demand of faster, cheaper and environmentally friendly isolation techniques [7]. These requirements can be fully accomplished by hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME), a relatively new and unexploited extraction technique [8]. As a consequence, there are just a few HF-LPME methods ready to be implemented in routine laboratories. Briefly, a liquid membrane of organic solvent is supported in the pores of a hollow fiber which is in contact with an aqueous donor phase (the sample) and an acceptor phase. If the acceptor phase is the same organic

solvent as the immobilized in the fiber, it is known as a two-phase system. On the other hand, if the acceptor phase is an aqueous solvent, the extraction is performed in a three-phase system. Liu et al. [9] have developed an extraction procedure for sampling OP and NP using 1-octanol supported on a microporous hollow fiber. Nevertheless, this procedure was not able to quantify both compounds at the required legislation levels since only a thin film of octanol, attached to the outer fiber surface, is employed to extract the compounds. Besides analytes need to be desorbed from the thin layer for analysis by HPLC, which increased the total analysis time. A recent work [10] proposed a three phase HF-LPME procedure for the extraction of the linear isomers n-OP and n-NP and later HPLC determination, which assures the compatibility between sample extract and chromatographic mobile phase and column, but provided lower enrichment factors than two phase configurations. However, incompatibility with LC solvents can be avoided by simple dilution with methanol [11].

The analysis of OP and NP by LC techniques is preferred over GC because there is no need to perform any derivatization step, which increases the total analysis time and may show low yields in complex matrices [12]. On the contrary, extracts obtained after a two phase configuration in HF-LPME are directly compatible with GC analyzers. This advantage has been applied in the analysis of NP and n-OP by GC-MS [13,14].

A relevant problem with the use of Electrospray ionization source (ESI) is the matrix effect [15–18]. Signal suppression or enhancement can affect drastically to sensitivity, precision and accuracy of the analytical results. Regarding alkylphenols, for example, Chen et al. [19] found around 50% signal reduction in river water for nonylphenol and other endocrine disruptor compounds, and Vega-Morales et al. [20] observed signal suppression for alkylphenols ranging from 9 to 24% in different wastewater treatment plant samples. Different approaches have been assayed to minimize matrix effect, being the use of Stable Isotope Labeled Internal Standard (SIL-IS) the most robust approach

[16–18]. Thus, matrix-effects associated to complex matrices can be properly overcome using a quantification methodology based on Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS). Classical IDMS, based on the use of methodological calibration curves requires the use of multiple labeled compounds to avoid overlapping in mass spectra. However, these multiple labeled compounds can induce isotopic effects, notably when deuterium isotopes are used. According to González-Antuña et al. [21,22] isotopic effects are not observed by the use of singly labeled analogues with ^{13}C . To avoid the overlapping problem in the mass spectra, Isotope Pattern Deconvolution (IPD) quantification tool can be used. IPD do not requires the construction of any calibration graph and has been tested satisfactorily for rapid quantifications in complex matrices [23–25]. Briefly, IPD permits to isolate distinct isotope signatures from mixtures of natural abundance and enriched tracer and the corresponding molar fraction for each compound. From the ratio of the molar fractions between natural and labeled compounds the concentration of the analyte in the sample can be directly obtained [21].

The aim of this study is the development and validation of a HF-LPME-UHPLC-MS/MS method for the determination of alkylphenols in complex water samples in a single run. OP and NP, the two most ubiquitous EU-regulated alkylphenols, are selected. Sample treatment has been minimized to avoid contamination and a HF-LPME in a two phase configuration has been developed using octanol as extraction phase. Quantification of OP and NP is based on the combination of minimal labeling and IPD. To this end, a minimal labeled $^{13}\text{C}_1$ -4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)-phenol and $^{13}\text{C}_1$ -t-octylphenol isomers were synthesized.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents and materials

4-tert-octylphenol (purity grade 99.0%) was obtained from Supelco (Bellefonte, PA, USA). In-house synthesized [25] $^{13}\text{C}_1$ -4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol ($^{13}\text{C}_1$ -NP) (purity 99% and $^{13}\text{C}_1$ -enrichment 98%) was also employed. In order to obtain the apparent concentration relative to technical nonylphenol of in-house synthesized $^{13}\text{C}_1$ -NP by reverse IDMS, we acquired two technical nonylphenol mixtures: technical nonylphenol (Pestanal, purity grade 95.4%) from Riedel de Haen (Seelze, Germany) and technical nonylphenol (purity grade 100.0%) by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Methanol (analysis grade), ammonium acetate (reagent grade) and hydrochloric acid (37%, reagent grade) were provided by Scharlau (Barcelona, Spain). For the extraction, 1-octanol (reagent grade, 99%) was obtained from Sigma-Aldrich Co. (Madrid, Spain). The pH of the mobile phase was adjusted approximately to 7 by adding ammonium hydroxide from Fluka (Buchs, Switzerland). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q gradient A10 (Millipore, Bedford, MA, USA). Drinking bottled water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles was also employed to test the effect of mobile phase composition in analyte sensitivity.

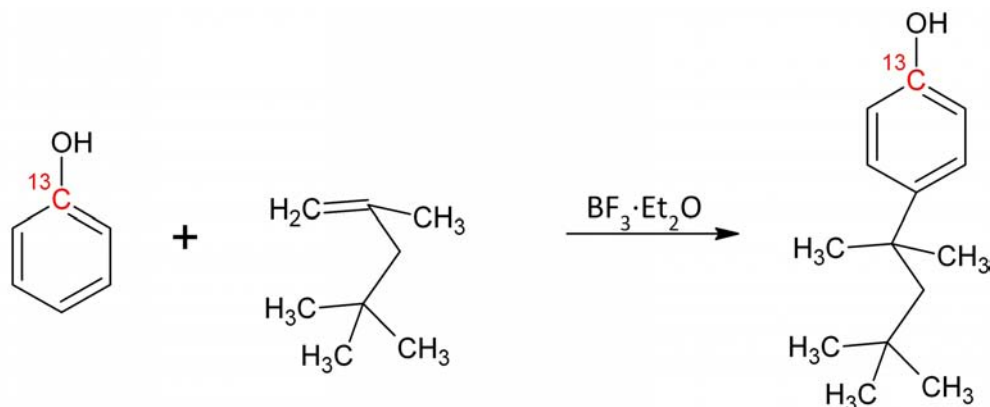


Figure 1. Synthesis pathway of labeled $^{13}\text{C}_1$ -4-tert-octylphenol($^{13}\text{C}_1$ -OP).

Individual stock solutions of alkylphenols were prepared by dissolving 50 mg, accurately weighted, in 50 mL of methanol. An intermediate mixed solution of OP, NP, $^{13}\text{C}_1$ -NP and $^{13}\text{C}_1$ -4-tert-octylphenol ($^{13}\text{C}_1$ -OP) at a concentration of 0.5 mg / L was prepared after mixing individual stock solution and dilution with methanol. An equivalent mixed solution with only the singly $^{13}\text{C}_1$ -labeled compounds was also prepared. Working solutions were subsequently prepared from the mixed solution by dilution the appropriate volume with methanol. All standard solutions (stock, intermediate and working solutions) were stored in amber glass bottles at -20°C in a freezer.

Accurel® Q3/2 polypropylene hollow fibers (600 μm i.d., 200 μm wall thickness and 0.2 μm pore size) were purchased from Membrana (Wuppertal, Germany).

For the synthesis of 4-tert-octylphenol, boron trifluoride (BF_3) diethyl etherate, hexane, 2,4,4-trimethylpent-1-ene (also known as diisobutene) and phenol were purchased from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). The $^{13}\text{C}_1$ -4-tert-octylphenol, ($^{13}\text{C}_1$ -OP) was synthesized using $^{13}\text{C}_1$ -phenol from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA).

2.2 Synthesis of $^{13}\text{C}_1$ -4-tert-octylphenol

The synthesis of $^{13}\text{C}_1$ -OP was based on an alkylation of $^{13}\text{C}_1$ -labelled phenol with diisobutene employing BF_3 -ether complex as catalyst [26]. The procedure is illustrated in Figure 1. As can be observed, the selected labeling position corresponds to the carbon linked to the hydroxyl group, which remains in the main fragment ions measured by tandem mass spectrometry.

Experimental procedure for the preparation of $^{13}\text{C}_1$ -OP: to a stirred solution of $^{13}\text{C}_1$ -labelled phenol (116.7 mg, 1.20 mmol) and diisobutene (154.0 mg, 1.36 mmol) in hexane (50 mL) was added boron trifluoride etherate (175 μL , 1.39 mmol). The resulting mixture was stirred overnight, then ice-water (50 mL) was added and extracted with hexane (2 x 25 mL). The organic layer was

washed (brine), dried (sodium sulfate), filtered and concentrated under vacuum to afford a white solid which was purified through liquid chromatography (silica-gel, hexanes: ethyl acetate (7:3)) to afford 182.5 mg (yield = 73%) and characterized by ^1H NMR and ^{13}C NMR.

Spectroscopic data of $^{13}\text{C}_1\text{-OP}$, ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.27 (1H, d, J = 8.9 Hz), 7.24 (1H, d, J = 8.9 Hz), 6.82 (1H, d, J = 8.9 Hz), 6.81 (1H, d, J = 8.9 Hz), 6.10 (1H, br s), 1.74 (2H, s), 1.38 (6H, s), 0.77 (9H, s); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz) δ 153.0, 142.3 (d, J = 8.3 Hz), 127.3, 114.7 (d, J = 66.2 Hz), 57.1, 38.0, 32.3, 31.8, 31.7 ppm.

Purity of the sought compound was evaluated by GC-EI-MS (see Figure 2). Since only one peak was obtained, the content of $^{13}\text{C}_1\text{-OP}$ was established as higher than 99 %. The mass spectra of the $^{13}\text{C}_1\text{-OP}$ and the natural analogue are also included in Figure 2. As can be observed, the main fragment ions corresponding to the labelled compound are shifted by one mass unit.

2.3 Instrumentation

Identification and quantification of analytes were carried out using an Acquity UPLC system (Waters Corp., Milford, MA, USA), equipped with a binary solvent manager and sample manager. An Acquity UPLC HSS T3 column 1.8 μm , 2.1 mm x 100 mm (i.d.) (Waters) was used. The column oven was set at 40 $^\circ\text{C}$, the flow rate was 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ and the injection volume was 20 μL . The separation was performed under isocratic conditions with a mobile phase consisted of 95% methanol/water with 0.01% ammonia and 0.1 mM ammonium acetate.

A TQD tandem mass spectrometer with an orthogonal Z-spray-electrospray interface (Waters) was used. The mass spectrometer was operated in negative mode electrospray ionization in selected reaction monitoring (SRM) mode.

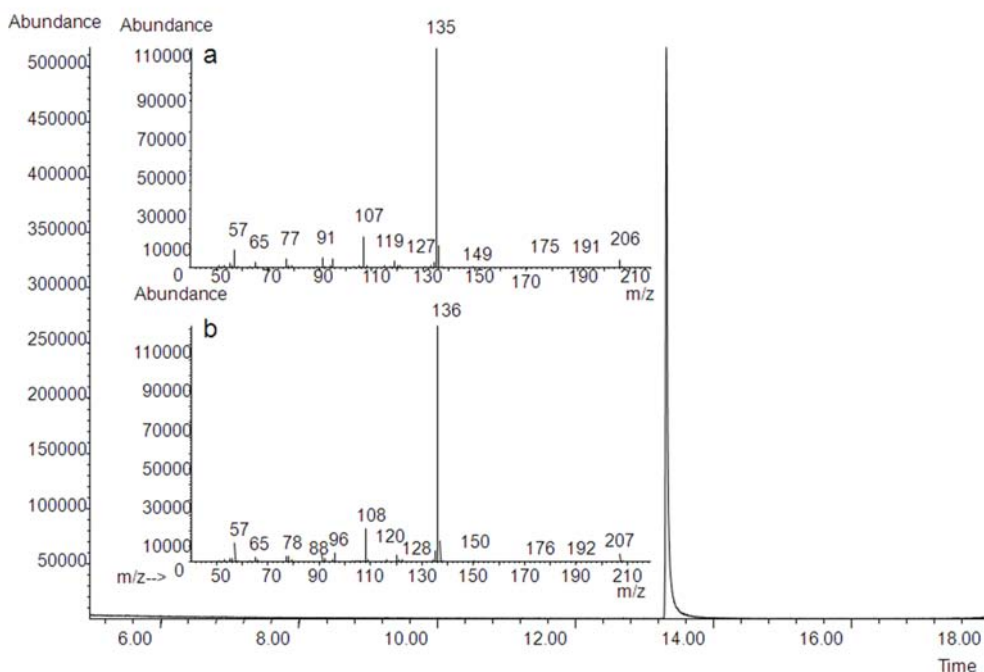


Figure 2. GC-EI-MS TIC chromatogram of $^{13}\text{C}_1$ -4-tert-octylphenol and mass spectra of a standard of **a** 4-tert-octylphenol and **b** $^{13}\text{C}_1$ -4-tert-octylphenol ($^{13}\text{C}_1$ - OP).

Drying as well as nebulising gas was nitrogen, obtained from a nitrogen generator N_2 LC-MS adapted for LC-MS analyzers (Claind, Teknokroma, Barcelona, Spain). The operating parameters of the spectrometer were capillary voltage 3.30 kV, and source and desolvation temperatures 120 and 350 $^\circ\text{C}$, respectively. The cone gas and desolvation flow were set at 40 and 400 L/h. For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Praxair, Madrid, Spain) with a pressure of approximately $4 \cdot 10^{-3}$ mbar in the collision cell. Dwell times of 0.1 s/scan were chosen. A sampling cone voltage of 35 V and a collision cell energy of 35 eV were set for the experiments. Masslynx v4.1 (Waters) software was used to process the quantitative data obtained.

Gas chromatography analyses were performed using an Agilent 6890 Series GC equipped with a split-splitless injection port, and mass spectrometric detector (Agilent 5973 N MSD) with an electron ionization (EI) source and MPS2 autosampler from Gerstel (Linthicum, MD, USA). The GC was fitted with a 30 m x 0.25-mm (i.d.), 0.25- μ m DB-5MS column (Hewlett-Packard). The column temperature was initially held at 60 °C for 1 min, and then a temperature ramp of 10 °C min⁻¹ was applied until 300 °C and this temperature was maintained for 1 min. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. Temperature of the injector was set to 280 °C and a sample volume of 2 μ L was injected in splitless mode.

2.4 Preparation of water samples

All effluent (EWW) and influent (IWW) wastewater samples with observable suspended particulate matter were decanted by pouring the water after sedimentation slowly from the sample bottles into clean 1 L glass (Schott-Duran) bottles[27]. IWW samples were diluted five times in Milli-Q water due to their high complexity and organic matter content. Then, 1 mL of ¹³C₁-NP and ¹³C₁-OP mixture solution was added to a 100-mL volumetric flask, where the water sample (20 mL of sample and Milli-Q water in the case of IWW) was used to fill it and to adjust the final volume, giving a final concentration of 0.1 μ g/L for each isotope-labeled internal standard. Accurate and precise results will be obtained when the ratio of concentrations between the natural and labeled compound is in the range of 0.1 to 10, according to the random error propagation theory [28].

2.5 Proposed hollow fiber extraction procedure

A cleaned 13 cm long fiber was soaked with 1-octanol for 5 seconds in order to impregnate the pores of the hollow fibers. Then the excess of 1-octanol on the outside was eliminated by washing the fiber 25 seconds in stirred Milli-Q water. The lumen of the hollow fiber was filled with 30 μ L of the acceptor phase, 1-octanol, using a 100- μ L HPLC microsyringe model 701N (outer

diameter 0.72 mm) from Hamilton (Bonaduz, Switzerland). Both open ends of the fiber were closed by means of heat sealing. These ends of the prepared hollow fiber were held by a stainless steel alligator clip holder attached to a wire and introduced into a 100 mL water sample contained in a volumetric flask. The sample was stirred for 30 min by means of a magnetic stirrer at 800 rpm. After extraction, octanol extracts were diluted with methanol and injected directly into the LC/MS system, avoiding pre-concentration or desorption steps. To do so, the fiber was taken out, both ends were cut and 270 μ L of methanol were flushed through the lumen using a 1-mL HPLC gastight syringe model 1001 (outer diameter 0.72 mm) from Hamilton (Reno, Nevada, USA) and directly introduced into a LC vial. Before injection in the HPLC system, samples were homogenized by agitation in a vortex during 5 seconds.

2.6 Cleaning procedure

As Salgueiro-González et al. highlight in their work [29], it is still complicated to have under control the blank levels in alkylphenols determinations. Nevertheless, it was established that rinsing with acetone and methanol was the fastest and simplest protocol to give low blanks. For this reason glassware was washed with tap water and then rinsed with acetone and methanol.

On the other hand magnetic stirrers were rinsed with acetone and sonicated 15 min in methanol before use. HPLC syringes were rinsed twice with acetone and twice with methanol between samples. Hollow fibers were cut into 13 cm pieces and sonicated in methanol 15 min to remove any contaminants and dried. Due to their low cost, fibers were discarded after being used to decrease memory effect and cross-contamination.

Finally it is essential to test if our LC vials septa contaminate samples with NP because we have observed that most PTFE/Silicone septa in LC vials filled with methanol release NP after a few hours. This fact was observed even when samples were stored in the fridge.

After applying all the cleaning procedure, reagent blanks obtained were within the range of 0.01-0.03 ng/mL. These results agreed with our previous works [25].

2.7 Determination of OP and NP by Isotope Pattern Deconvolution

The quantification of NP and OP was carried out by Isotope pattern deconvolution (IPD). Briefly, this is a mathematical tool employed in IDMS to obtain directly the concentration of each compound by multiple linear regression. This approach assumes that the final isotopic composition observed in the mixture is a combination of the analyte and the isotopically enriched spike [21,30,31]. It should be noted that isotope distributions are relative magnitudes whose measurement are independent of matrix effect.

The simultaneously determination of NP and OP was carried out by the construction of two system of equations, (1) and (2) respectively, which were solved by multiple linear regression in order to obtain the molar fractions (X_{nat} and X_{lab}) of each natural abundance and labeled alkylphenol. The quantification of NP was carried out employing three transitions: 219> 133, 220 > 134 and 221> 135. In the case of OP, transitions selected were: 205> 133, 206 > 134 and 207> 135. Only three transitions of each compound were selected, according to the random error propagation theory, to make possible the application of this alternative technique in routine multi-residue analysis.

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{219 > 133} \\ A_{mix}^{220 > 134} \\ A_{mix}^{221 > 135} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{219 > 133} & A_{lab}^{219 > 133} \\ A_{nat}^{220 > 134} & A_{lab}^{220 > 134} \\ A_{nat}^{221 > 135} & A_{lab}^{221 > 135} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{219 > 133} \\ e^{220 > 134} \\ e^{221 > 135} \end{bmatrix} \quad (1)$$

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{205 > 133} \\ A_{mix}^{206 > 134} \\ A_{mix}^{207 > 135} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{205 > 133} & A_{lab}^{205 > 133} \\ A_{nat}^{206 > 134} & A_{lab}^{206 > 134} \\ A_{nat}^{207 > 135} & A_{lab}^{207 > 135} \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{205 > 133} \\ e^{206 > 134} \\ e^{207 > 135} \end{bmatrix} \quad (2)$$

In this system of equations $A_{mix}^{i>j}$ values corresponds to the measured relative abundance of the compound in the mixture for the SRM transition of nominal masses $i > j$, $A_{nat}^{i>j}$ and $A_{lab}^{i>j}$ values the theoretically calculated or experimentally measured abundances for the natural and labeled alkylphenol and $e^{i>j}$ is the error vector of the multiple linear regression. As Castillo et al. depict in their work [24], in tandem mass spectrometry (QqQ) in Selected Reaction Monitoring (SRM) it is also necessary to compute the contribution of the different isotopes (mainly ^{13}C , ^{17}O , ^2H) to the calculation of the product ions mass isotopomer distribution of natural abundance and isotope-labeled compound. The resulting mass isotopomer distribution coming from each isotope pattern can be obtained using the software *Isopatrn* implemented by L. Ramaley et al. [32]. The amount (mols) of each natural abundance alkylphenol in the sample, N_{nat} , is then calculated using equation (3) where the amount (mols) of labeled compound added, N_{lab} , must be known.

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{X_{nat}}{X_{lab}} \quad (3)$$

Accordingly, quantification of alkylphenols becomes a fast process: one injection provides one result, free of matrix effect, without the need to prepare a calibration curve.

The confirmation of the presence of NP was carried out by calculating the peak area ratios between the quantification transition (Q) 219 > 133 and the confirmation transition (q) 219 > 147, and comparing them with ion-ratios from a reference standard. The same criteria could not be applied to the confirmation of OP since no other sensitive transition was observed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Study of the injection solvent effects on separation and ionization

Theoretically octanol is a very convenient acceptor solution for OP and NP in a 2-phase HF-LPME system due to their high partition coefficient values ($\log K_{ow}$ for the phenols were 4.12 and 4.48 for OP and NP, respectively) [9,33]. Nevertheless, if the acceptor is an organic solvent the extracts are directly compatible with GC but not always with LC or CE. As a consequence the main constrain step in two-phase HF-LPME prior to LC analysis is to make organic sample extracts compatible with mobile phase. The fastest way to make octanol extracts compatible with our selected chromatographic conditions was its dilution in methanol [11].

To test the effect of the presence of octanol in sample extracts in terms of compatibility, peak shape and sensitivity we injected different solutions containing 0.1 μ g/mL of both alkylphenols that were prepared using different ratios octanol:methanol, namely 0:9, 1:9 and 2:9 (v/v). Both Milli-Q and bottled water modified with different percentages of ammonia were studied maintaining a constant concentration of 0.1 mM of NH_4Ac in the mobile phase. Under the isocratic conditions of 95% methanol assayed no problems of peak shape with mobile phase were found for the octanol:methanol ratios used. Regarding sensitivity, as can be observed in Figure 3, octanol extracts diluted with methanol 1:9 (v/v) assures the maximum sensitivity. In these conditions, the signal (normalized areas) increased three times compared to extracts in pure methanol.

To the best of our knowledge, the signal enhancement of NP and OP in methanol extracts when modified with octanol and detected by ESI has never been described before. This effect, not well understood, is probably due to modification of surface tension of aerosol generated which can enhance the ion concentration in the gas phase.

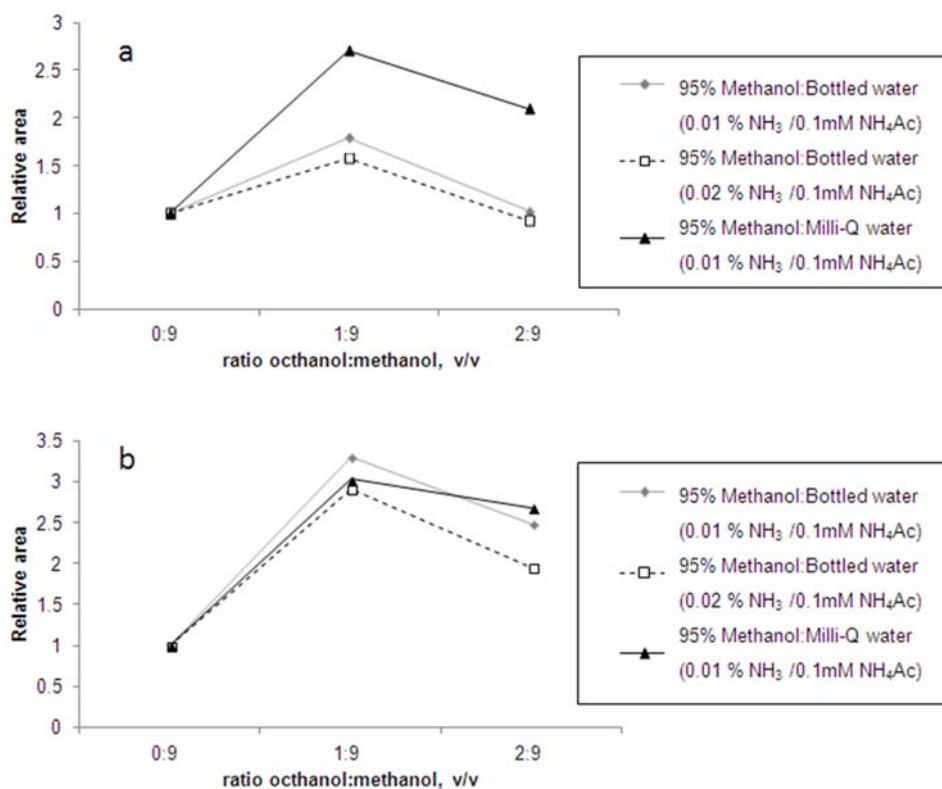


Figure 3. Signal enhancement obtained for octylphenol (OP) (a) and technical nonylphenol (NP) (b) in ESI source with different ratios octanol: methanol in the injected extract. The relative area was obtained by normalizing the signal given by the extracts without any octanol.

Taking into account the low signal sensitivity of alkylphenols, especially for OP determinations, the presence of octanol in the final extract can permit to achieve the low levels required in legislation. Thus, 1:9 dilution with methanol are the conditions used to avoid compatibility problems of 1-octanol.

3.2 Characterization of $^{13}\text{C}_1$ -OP and $^{13}\text{C}_1$ -NP by LC-MS/MS

3.2.1 Calculation of the cluster purity and the extent of the $^{13}\text{C}_1$ enrichment

As stated above, equations (1) and (2) require the accurate knowledge of the relative abundances of the natural and the labeled compounds. Theoretical calculation of those abundances after a fragmentation process in the QqQ mass spectrometer must take into account the spectral purity. Moreover, for the labeled compound, the enrichment of $^{13}\text{C}_1$ atom should be known.

Both the procedure to characterize the spectral purity and the extent of $^{13}\text{C}_1$ labeling in synthesized alkylphenols has been described in a previous work [25]. NP showed a contribution of 96.0 ± 0.3 for $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{14}]^-$ and 4.0 ± 0.3 % for $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{15}]^-$ when prepared in methanol extracts [25]. OP characterization was performed monitoring the fragment clusters $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{12}]^-$, $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{13}]^-$ and $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{11}]^-$. Our results showed a contribution of 98.10 ± 0.13 for $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{12}]^-$ and 1.9 ± 0.13 % for $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{13}]^-$ clusters but no contribution for the $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{11}]^-$ cluster. Both compounds were also characterized in octanol:methanol (1:9, v/v) extracts but we did not observe differences compared to the pure methanol extracts. Consequently, the theoretical isotopomer distribution of the each natural abundance alkylphenol was recalculated to include the contribution of the cluster with an extra loss of hydrogen during the fragmentation step in the QqQ mass spectrometer.

Extent of $^{13}\text{C}_1$ labeling in synthesized $^{13}\text{C}_1$ -OP was obtained by comparing the observed cluster with those calculated for theoretical enrichments of the labeled compound from 97.6 to 99.9% $^{13}\text{C}_1$. Since a clear minimum was obtained for around 99 atom % $^{13}\text{C}_1$, the theoretical isotopomer distribution of the labeled compound was calculated assuming a $^{13}\text{C}_1$ enrichment of 99%. For the labeled NP a 98% of enrichment in $^{13}\text{C}_1$ was assumed [25]. Once obtained the whole isotope distribution of $^{13}\text{C}_1$ -NP and $^{13}\text{C}_1$ -OP, the IPD approach can be applied.

3.2.2 Quantification of the labeled compounds by Reverse Isotope Dilution

The proposed approach of IPD requires the determinations of the exact concentration of the labeled compound. For this purpose, each isotopically enriched compound was mixed with known amount of its corresponding natural analogue, prepared in triplicate, and determined by reverse isotope dilution (RID) mass spectrometry by LC-MS/MS. The concentration of $^{13}\text{C}_1\text{-OP}$ was obtained against a certified OP standard from Supelco and resulted in a concentration of $950 \pm 40 \mu\text{g/mL}$ of the stock solution. This agrees with the expected concentration taken into account a 99% purity. For the quantification of NP the specific problem related with the unknown composition of the technical mixture should be considered. Since legislation establishes the maximum concentration values for the technical mixture of nonylphenol, an apparent concentration of the selected singly labeled isomer $^{13}\text{C}_1\text{-NP}$ was obtained using two different commercially available technical nonylphenol mixtures. Purity of each NP mixture was certified by the manufacturer. RID calculations of $^{13}\text{C}_1\text{-NP}$ provides an equivalent concentration of technical nonylphenol of around $2270 \mu\text{g/mL}$ using any of the technical nonylphenols mixtures tested (Table 1). The theoretical concentration of $^{13}\text{C}_1\text{-NP}$ was $1385 \mu\text{g/mL}$ which agrees with the results obtained by RID against the natural analogue synthesized in the laboratory (Table1). RID with commercial NP provides an apparent concentration of the $^{13}\text{C}_1\text{-NP}$ spike solution 1.6 times higher than the real concentration. This can be due to higher ionization efficiency of the synthesized nonylphenol isomer compared to the overall nonylphenol mixture. As a consequence, the concentration of $^{13}\text{C}_1\text{-NP}$ spike solution was established as $2270 \mu\text{g/mL}$ for quantification purposes.

3.3 Optimization of the HF-LPME experimental parameters

Several parameters are known to affect the HF-LPME efficiency including the selection of organic acceptor solvent, the optimization of the donor phase pH, the extraction time and the effect of salting out [34]. The effect of some of them

Table 1. Concentration ($\mu\text{g/mL}$) of $^{13}\text{C}_1$ -NP solution calculated by reverse IDMS using two different commercially available NP mixtures. Theoretical concentration of $^{13}\text{C}_1$ -NP was 1385 $\mu\text{g/mL}$. Nonylphenol isomer 363-NP refers to 4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol.

Manufacturer of the NP mixture	Riedel-de Haen	Dr. Ehrenstorfer	In-house synthesized 363-NP
Purity (%)	95.7	100	99.9
Calculated concentration ($\mu\text{g/mL}$) of $^{13}\text{C}_1$ -NP in the spike solution	2275 ± 57^a	2268 ± 88	1415 ± 68
Ratio between calculated and theoretical concentration of $^{13}\text{C}_1$ -NP	1.64 ± 0.04	1.64 ± 0.06	1.02 ± 0.05

^aThe uncertainty of the values corresponds to 1s standard deviation of three independent replicates injected three times each.

are assessed through the Enrichment Factor (E_f) which represents the quotient between the final concentration of the analyte in the extraction solvent C_e and the initial concentration of the analyte within the aqueous sample, C_s :

$$E_f = C_e / C_s \quad (4)$$

As described in previous sections in this paper 1-octanol shows high partition coefficient for alkylphenols and total compatibility with the LC mobile phase without further treatment once diluted in methanol. Moreover it has been tested as adequate organic acceptor in previously reported works [9]. Thus, octanol has been chosen as acceptor phase.

The final concentration C_e was determined by an external calibration curve prepared in octanol:methanol (1:9, v/v). To this end, increasing concentrations (5-1000 ng/mL) of NP and OP were injected in duplicate through the UHPLC-MS/MS. The calibration graph was built using transitions 219 >133 for NP and

205>133 for OP. We spiked samples at a level of 5 ng/mL and extracted them depending on the parameter to be optimized. All the determinations were averaged from three replicate measurements. In order to promote the extraction from the donor phase all samples were stirred at 800 rpm, the maximum speed that did not produce a vortex when samples were into a volumetric flask.

Analytes to be extracted must be in a non-ionized form in the sample to be transferred into the organic phase. Because of the weak acid nature of the selected alkylphenols (pKa values around 10) the effect of the acidity of the donor phase was studied. For that purpose Milli-Q water samples were prepared at pH values between 1-6 adjusted with HCl and extracted at 800 rpm for 30 min. As can be observed in Figure 4a, the enrichment factor was not improved with the addition of HCl. These results agree with Liu et. al. [9] who found that pH had a significant effect in the kinetics but not in the equilibrium distribution in the extraction of OP and NP. Thus, pH of the water samples was not modified and was maintained to pH 7.

The influence of extraction time was also tested. For this study, water samples were extracted under the optimized conditions. The results are shown in Figure 4b. The E_f slightly increased up to 45 min for OP while it became constant for NP after a 30 min extraction. Although an extraction time of 45 min provided higher sensitivity for OP, a 30 min extraction time was selected as a compromise between sensitivity and time of the analysis.

3.4 Method validation

For validation purposes the developed method was evaluated in three types of water samples (Milli-Q, EWW and IWW). It was not possible to find a real blank sample for any of the studied matrices, recommendable for validation purposes, so the blank value was subtracted from fortified samples. This resulted in higher errors in the recovery calculation.

Precision and accuracy of the overall analytical procedure were evaluated by spiking the samples at two different concentration levels (0.1 and 1 ng/mL), and analyzing them in quintuplicate. Concentration levels were increased in IWW (1 and 10 ng/mL) because of its higher endogenous nonylphenol concentration. In relation to the LOQ, we decided to establish a LOQ objective at 0.1 ng/mL for both compounds. This concentration level was established according to the annual average value for NP (0.3 ng/mL) and OP (0.1 ng/mL), which were the most restrictive values included in the EU Directive for water [2]. For the measurements, the labeled compounds, $^{13}\text{C}_1$ -OP and $^{13}\text{C}_1$ -NP, were added at the same concentration level as the natural compounds.

Figure 5 shows the chromatograms corresponding to the different spiked water samples analyzed at the low validation level. As can be observed, the minimally ^{13}C labeled standards and each corresponding analyte co-elute, thus chromatographic isotopic effects were avoided. Coelution of the isotope labeled IS with analyte, which physico-chemical properties are the same, is the key parameter to be affected by the same matrix and, therefore, to compensate its effect [16–18]. Moreover, the expected problem for conventional IDMS, based in the use of a calibration graph, of mass spectrum overlapping is overcome using the IPD calculation procedure [21–23]. Therefore, taking into account that IPD calculations are based on the measurement of isotopic abundances in the sample spiked with the labeled compound, any possible matrix effect are effectively compensated. Quantification transitions, employed for IPD calculations, are referred to as OP(1), OP(2), OP (3), NP(1), NP(2) and NP(3) for octylphenol and nonylphenol respectively. All the three SRM transitions could be acquired at this low level for all analytes, making the reporting data highly confident.

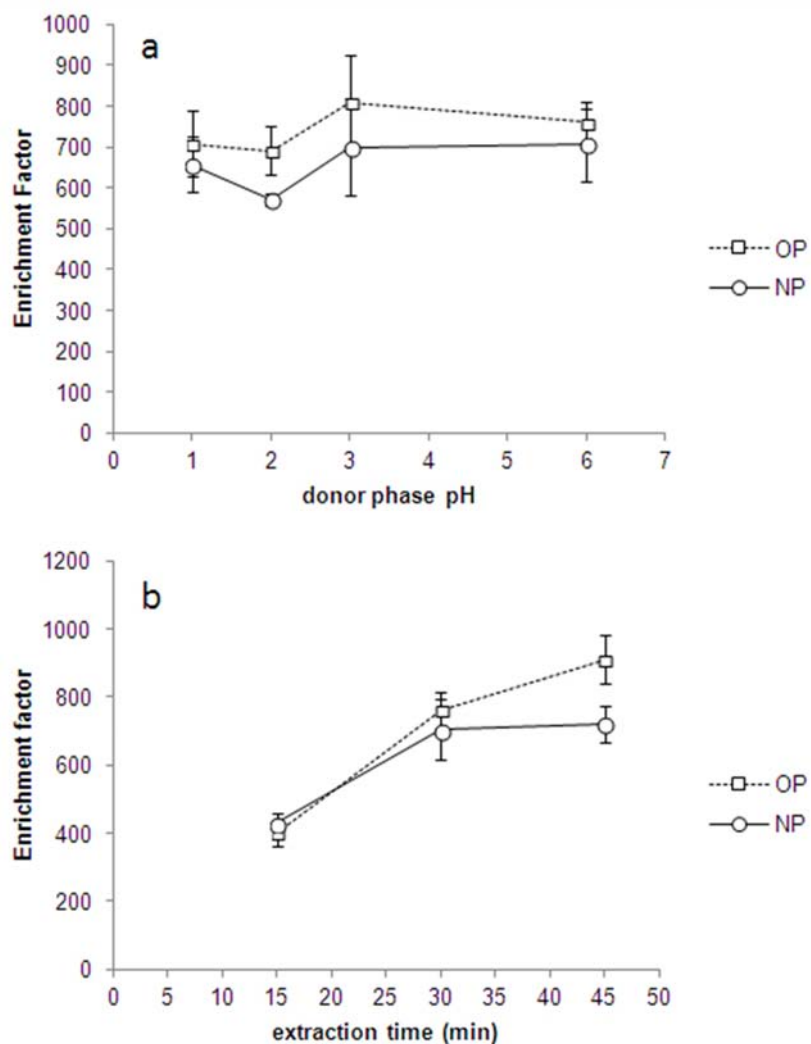


Figure 4. Influence of some relevant parameters in the HF-LPME of technical nonylphenol (NP) octylphenol (OP). (a) Influence of the donor phase pH and (b) influence of the stirring time (800 rpm). The error bars depicting the associated uncertainty (1s) of three replicates are represented at each extraction condition.

Positive findings of NP were confirmed by calculation the peak area ratio between the most intense transition (Q, 219> 133) and the confirmation transition (q, 219> 147) (Figure 5) according to European Commission Decision 2002/657/EC [35]. This decision only applies to residues of veterinary medicinal products but provides added confirmation criteria in complicated compounds such as NP. However, confirmation using the Q/q ratio for OP was not possible according to this decision since this compound does not present other sensitive transition. Nevertheless, applying these criteria for confirmation purposes is not mandatory when IPD calculation tool is used and it has not been employed in previous works [22,23].

Table 4. Recovery and blank values for technical nonylphenol (NP) and 4-tert-octylphenol (OP) in Milli-Q water and effluent and influent waste water obtained by minimal labeling IDMS and isotope pattern deconvolution calculations.

Sample	Validation level (ng/mL)	Blank value (ng/mL)		Recovery (%)	
		OP	NP	OP	NP
Milli-Q water	0.1	0.0263 ± 0.0019	0.0960 ± 0.0024	105 ± 12	104 ± 12
	1			106 ± 7	100.8 ± 1.8
Effluent Wastewater	0.1	0.057 ± 0.016	0.166 ± 0.004	105 ± 10	107 ± 13
	1			108 ± 7	99 ± 4
Influent Wastewater	1	0.138 ± 0.010 ^a	1.09 ± 0.06	109 ± 12	97 ± 10
	10			108 ± 8	97 ± 6

^aThe uncertainty of the values corresponds to 1s standard deviation of three independent replicates injected three times each.

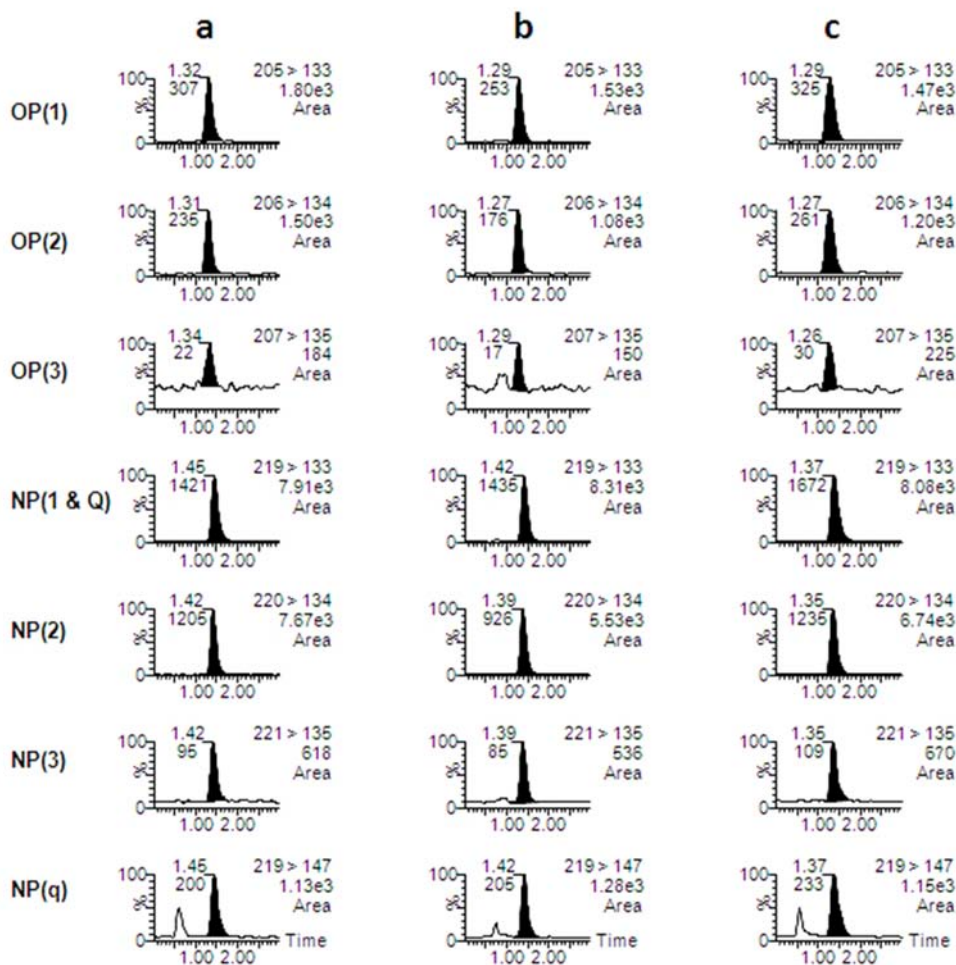


Figure 5. Chromatograms in negative electrospray ionization for nonylphenol (NP) and octylphenol (OP) in; (a) Milli-Q water at 0.1 ng/mL, (b) effluent wastewater 0.1 ng/mL, and (c) influent wastewater at 1 ng/mL.

The precision of the method, expressed as relative standard deviation (in percent), were below 12%, meeting the SANCO guideline [36] which proposes $RSD \leq 20\%$. On the other hand, the accuracy of the method was evaluated by

recovery studies and values within 97-109% were obtained. These were within the range required by the SANCO guideline (between 70% and 120%) (See Table 2). These results demonstrate that the developed procedure based on $^{13}\text{C}_1$ -labeled compounds and isotope pattern deconvolution could be very useful to carry out a reliable and fast determination of OP and NP in environmental waters at the levels established by the legislation.

4. CONCLUSIONS

In this work, a method for the determination of OP and NP in water samples based on UHPLC-MS/MS has been developed and satisfactorily validated. In this method, the coelution in the same chromatographic peak allows the determination of all NP isomers showing the same fragmentation pathway. To this end, the $^{13}\text{C}_1$ -labeled NP synthesized must be quantified using the commercially available technical mixture of NP. The certification of an apparent concentration for the labeled compound higher than the real one agrees with the variability in the ionization efficiency and fragmentation inside the technical mixture. This fact makes the assessment of endocrine disruptive activity of NP still a challenge.

HF-LPME, with 1-octanol as acceptor phase, has shown as a reliable (repetitive and efficient) and fast method to extract and preconcentrate AP from water samples, making the whole method rapid and sensitive enough to reach the regulated concentration of AP in environmental waters. Incompatibility of 1-octanol with aqueous LC mobile phase has been effectively eliminated by simple dilution with methanol. On the other hand, the remaining 10% of 1-octanol provides three fold enhancement in the ESI signal for OP and NP.

Regarding quantification, IPD calculations have been proven to be fast, providing one result per sample injection. Quantification, based in IDMS through $^{13}\text{C}_1$ -labeled AP has demonstrated to be free of matrix effect, precise and accurate.

In summary a fast and reliable method has been finally obtained, which do not rely on the use of a calibration graph, which correctly accounts for the matrix effect and is sensitive enough to reach the regulated limits of concentration for OP and NP in water samples. Due to the low cost of the fibers and the overall low time consumption the proposed methodology can be easily implemented in routine laboratories.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the financial support from Generalitat Valenciana (Research group of excellence Prometeo 2009/054). N.Fabregat-Cabello also acknowledges the Generalitat Valenciana for her Ph.D. research grant under the Program VALi+D. Finally the authors are very grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using Acquity and TQD instruments.

REFERENCES

- [1] R. Loos, J. Wollgast, J. Castro-Jimenez, G. Mariani, T. Huber, G. Locoro, G. Hanke, G. Umlauf, G. Bidoglio, P. Hohenblum, W. Moche, S. Weiss, H. Schmid, F. Leien-decker, T. Ternes, A.N. Ortega, A. Hildebrandt, D. Barcelo, P. Lepom, I. Dimitrova, O. Nitcheva, S. Polesello, S. Valsecchi, S. Boutrup, O. Sortkjaer, R. de Boer, J. Staeb, , *Trend. Anal. Chem.* 27 (2008) 89–95.
- [2] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, 2013.
- [3] E. Stottmeister, O.P. Heemken, P. Hendel, G. Donnevert, S. Frey, H. Allmendinger, G. Sawal, B. Jandel, S. Geiss, R. Donau, A. Koch, I. Heinz, M. Ottaviani, E. Veschetti, W. Hartl, C. Kubwabo, C. Benthe, V. Tobinski, H. Woldmann, R. Spilker In, *Anal. Chem.* 81 (2009) 6765–6773.
- [4] E. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galceran, *Mass. Spectrom. Rev.* (2010) 776–805.
- [5] S. Rabouan, A. Dupuis, A. Cariot, M. Albouy-Llaty, B. Legube, V. Migeot, *Trend. Anal. Chem.* 37 (2012) 112–123.
- [6] E. Olkowska, Ż. Polkowska, J. Namieśnik, *Talanta.* 88 (2012) 1–13.
- [7] M.Á. Bello-López, M. Ramos-Payán, J.A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, *Anal. Lett.* 45 (2012) 804–830.
- [8] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *J. Chromatogr. A.* 1184 (2008) 132–42.
- [9] J. Liu, X. Hu, J. Peng, J.A. Jönsson, P. Mayer, G. Jiang, *Anal. Chem.* 78 (2006) 8526–8534.
- [10] M. Villar-Navarro, M. Ramos-Payán, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, M.Á. Bello-López, *Sci. Total Environ.* 443 (2013) 1–6.
- [11] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A.* 1223 (2012) 1–8.
- [12] A.R. Fischer, N.T.P. Lan, C. Wiedemann, P. Heide, P. Werner, A.W. Schmidt, G. Theumer, H.-J. Knölker, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2950–2955.
- [13] C. Basheer, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A.* 1057 (2004) 163–169.
- [14] S. Müller, M. Möder, S. Schrader, P. Popp, *J. Chromatogr. A.* 985 (2003) 99–106.
- [15] P.J. Taylor, *Clini. Biochem.* 38 (2005) 328–334.
- [16] W.M.A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli, *Mass. Spectrom. Rev.* 25 (2006) 881–899.

- [17] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, *Talanta*. 115 (2013) 104–122.
- [18] H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, A. Cappiello, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491–509.
- [19] W.L. Chen, G.S. Wang, J.C. Gwo, C.Y. Chen, *Talanta*. 89 (2012) 237–245.
- [20] T. Vega-Morales, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, *J. Chromatogr. A*. 1230 (2012) 66–76.
- [21] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, *Analyst*. 135 (2010) 953–964.
- [22] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, I. Lavandera, G. Centineo, V. Gotor, J.I. García Alonso, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 1879–1888.
- [23] A. González-Antuña, J.C. Domínguez-Romero, J.F. García-Reyes, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, A. Molina-Díaz, *J. Chromatogr. A*. 1288 (2013) 40–47.
- [24] A. Castillo, E. Gracia-Lor, A.F. Roig-Navarro, J. V. Sancho, P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, *Anal. Chim. Acta*. 765 (2013) 77–85.
- [25] N. Fabregat-Cabello, Á. Castillo, J. V. Sancho, F. V. González, A.F. Roig-Navarro, *J. Chromatogr. A*. 1301 (2013) 19–26.
- [26] J.H.P. Tyman, *Synthetic and natural phenols*, Elsevier B.V., Amsterdam, 1996: pp. 358–394.
- [27] R. Loos, G. Locoro, S. Contini, *Water Res.* 44 (2010) 2325–2335.
- [28] J.I. García Alonso, *Anal. Chim. Acta*. 312 (1995) 57–78.
- [29] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *Talanta*. 101 (2012) 413–419.
- [30] J. Meija, L. Yang, J. a. Caruso, Z. Mester, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 1294–1297.
- [31] P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 25 (2010) 239–259.
- [32] L. Ramaley, L. Cubero Herrera, *Rapid Commun. Mass Sp.* 22 (2008) 2707–2714.
- [33] M. Ahel, W. Giger, *Chemosphere*. 26 (1993) 1471–1478.
- [34] M. Saraji, A.A.H. Bidgoli, B. Farajmand, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1708–1715.
- [35] European Union Decision 2002/657/EC, *Off. J. Eur. Commun.* L221 (August) (2002) 8.

[36] European Commission, DG-SANCO, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed, Document No. SANCO/12495/2011, Brussels, December 2011,
<http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/docs/qualcont> 2012

3.4 Comparación de métodos de extracción convencionales (SPE) y no convencionales (HF-LPME) para la determinación de disruptores endocrinos en aguas

Entre los cientos de compuestos sospechosos de poseer capacidad disruptora endocrina se encuentra el bisfenol A (BPA) (2,2-bis[4-hidroxifenil] propano), cuyos posibles efectos nocivos todavía generan controversia dentro y fuera de la comunidad científica.

El bisfenol A (ver estructura en la Figura 3.5) es un plastificante ampliamente producido y usado en todo el mundo desde hace más de cincuenta años. A modo de ejemplo, es un monómero clave en la preparación de resinas tipo epoxi y del plástico tipo policarbonato. Su aplicación incluye un elevado número de productos de consumo habituales, tales como CDs, DVDs, botellas de agua, recipientes para microondas, tuberías y recubrimientos internos de latas. Cuando se hidroliza el enlace éster en policarbonatos y resinas se libera BPA que puede llegar a las bebidas o alimentos envasados y/o al medio ambiente. Como consecuencia directa, los humanos nos encontramos expuestos de forma ubicua a niveles biológicamente activos de este compuesto¹⁹.

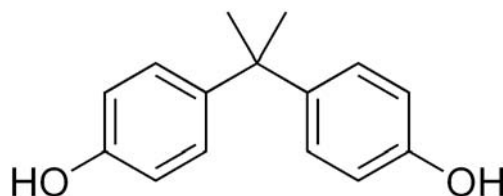


Figura 3.5 Estructura del bisfenol A (BPA).

Diversos estudios demuestran que la presencia de BPA puede originar, entre otros efectos, esterilidad, aumento de la producción de testosterona e incluso cáncer de próstata²⁰. Por otra parte, un informe de la FDA del 2010 lo identificó también como potencialmente peligroso para fetos y niños pequeños²¹. A pesar de estos datos, su uso sólo se ha restringido a nivel mundial en la producción de biberones. Únicamente el gobierno francés dio un paso más allá en 2013, prohibiendo su uso en todos los envases destinados a uso alimentario a partir del 2015. No obstante la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) reiteró sólo unas semanas más tarde de la entrada en vigor de esta normativa, el 21 de enero de 2015, que no existía ningún problema de salud asociado a los niveles actuales de BPA a los que se encuentra actualmente expuesta la población²².

Con respecto al ámbito de las aguas medioambientales, la Unión Europea no establece niveles máximos permitidos en la legislación vigente, aunque distintos estudios muestran que es habitual encontrar niveles de BPA del orden de las ppb^{23,24}.

Desarrollo experimental

En el presente trabajo se ha estudiado la extracción simultánea de BPA, OP y NP en aguas mediante dos técnicas diferentes. Se ha desarrollado un método para una técnica perfectamente establecida como es la SPE y se ha comparado con otro desarrollado para la HF-LPME, una técnica de más reciente implantación. Se han estudiado ventajas e inconvenientes de ambos métodos y se ha profundizado en el potencial real de la HF-LPME. El trabajo queda recogido en la cuarta contribución científica contenida en esta tesis.

Siguiendo la línea que une a todos los trabajos de esta tesis, el bisfenol A ha sido cuantificado mediante espectrometría de masas de dilución isotópica llevada a cabo por medio de la deconvolución de perfiles isotópicos. A diferencia de los dos trabajos anteriores, no se realizó la síntesis del análogo de

BPA marcado con un solo ^{13}C . Así, el compuesto enriquecido isotópicamente $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA (con todos los ^{12}C sustituidos por ^{13}C) fue adquirido a una firma comercial.

Una de las mejoras aportadas respecto a los trabajos anteriores ha sido la optimización de las condiciones cromatográficas, utilizando como fase móvil una mezcla metanol:agua (97:3) modificada con 0.01% de NH_3 en condiciones isocráticas. Este cambio respecto a los trabajos anteriores se debe a que se ha observado que la presencia de NH_4Ac disminuye la intensidad de señal de los tres compuestos, sobre todo la del BPA. Esta modificación, junto a una mejor optimización de las condiciones de adquisición del espectrómetro de masas (ver la "Table 1" del apartado siguiente), permitió reducir el volumen de muestra, con respecto al primer trabajo incluido en este bloque, de 200 a 100 mL. Además, la mejora de la señal permitió realizar la confirmación de los tres compuestos mediante la adquisición de una transición extra, hecho que no fue posible en el caso del octilfenol en el segundo trabajo.

Por otra parte también se estudió durante la separación cromatográfica el uso de gradientes, pero esta opción se descartó ya que la presencia de EDCs en las fases móviles propició una acumulación de dichos compuestos durante los ciclos de inyección.

Como ya se ha indicado en numerosas ocasiones anteriormente, el mayor problema asociado a la determinación de alquilfenoles es la contaminación que aparece tanto en el material de laboratorio como en las muestras de agua, no siendo posible encontrar blancos de muestra. Por este motivo, una de las acciones realizadas para reducir los niveles de nonilfenol en el agua de calidad Milli-Q fue adaptar un filtro de carbono, el EDS-PAK de Millipore, al sistema expendedor de agua de esta misma marca. La función de éste es la reducción de la concentración de nonilfenol, entre otros EDCs, por debajo de la $0.1 \mu\text{g/L}$. Sin embargo, el agua obtenida contenía concentraciones del NP superiores a $0.3 \mu\text{g/L}$, hecho que obligó a realizar los estudios de fortificación de nuevo en

agua embotellada. Además, también existieron problemas para encontrar agua de depuradora con un nivel de NP cercano a 0.1 µg/, por lo que se tuvieron que realizar diversos muestreos. Como se puede observar en la Figura 3.6 (a), durante el tratamiento de muestra se intentó evitar el contacto con material de plástico para minimizar toda posible fuente de contaminación, utilizando cartuchos de SPE confeccionados en vidrio e incluso adaptadores de politetrafluoroetileno (PTFE) entre estos y las jeringas utilizadas a modo de depósito.

En base a trabajos previos y teniendo en cuenta la escasa disponibilidad de cartuchos SPE de vidrio, la optimización de la SPE fue realizada únicamente en cartuchos de tipo C18. Cabe mencionar que experiencias anteriores con extracciones de OP y NP en aguas utilizando cartuchos con relleno polimérico OASIS HLB no dieron resultados satisfactorios en el caso del OP; otro motivo por el que fueron descartados. Durante la optimización, se evaluaron cuatro disolventes de elución (metanol, acetonitrilo, acetona y hexano) y se recogieron dos fracciones de 5 mL para cada uno, llevando los extractos a sequedad en todos los casos y reconstituyéndolos en 0.5 mL de metanol. Se observó que las condiciones más adecuadas entre las estudiadas fue la elución con 5 mL de acetonitrilo, obteniendo una recuperación del 78% para el BPA, del 68% para el OP del y del 59% para el NP.

En lo que se refiere a la optimización de la microextracción en fase líquida haciendo uso de fibras huecas (HF-LPME), se estudiaron distintas fasesceptoras (octanol, dietiléter y tolueno) así como diversos tiempos de extracción (15, 30 y 45 min). De nuevo, las condiciones óptimas para los tres compuestos se alcanzaron mediante una extracción de media hora utilizando octanol como fase aceptora. En este caso, la recuperación absoluta del BPA fue del 10% y del 15% y 12% para el OP y el NP respectivamente. Los montajes realizados para ambos tipos de extracciones se pueden consultar en la Figura 3.6.

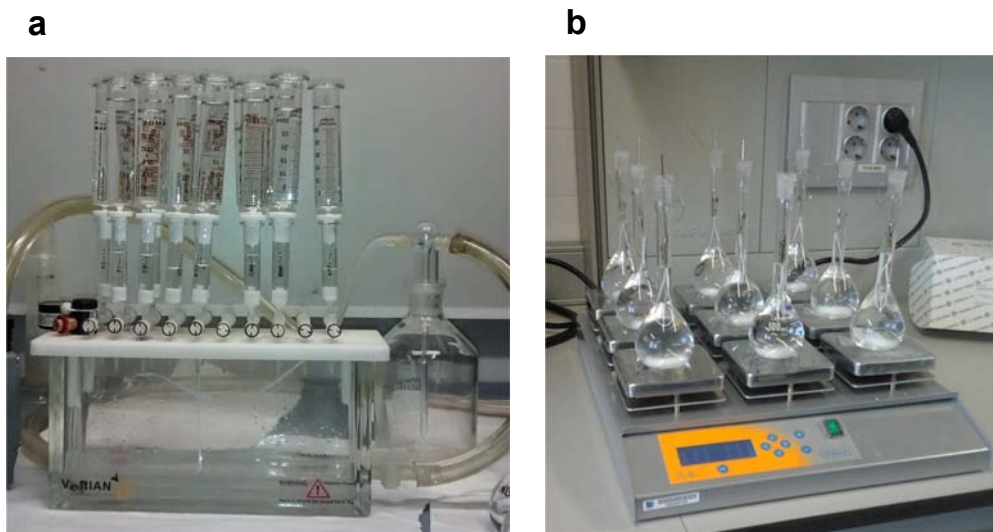


Figura 3.6 Montajes utilizados para la extracción y concentración de disruptores endocrinos en aguas por SPE (a) y HF-LPME (b).

Las metodologías desarrolladas se validaron satisfactoriamente en agua residual depurada, agua superficial y agua embotellada, a dos niveles de concentración (0.1 y 1 $\mu\text{g/L}$ para OP y NP y 0.5 y 5 $\mu\text{g/L}$ para BPA). El mayor nivel de fortificación seleccionado para el BPA se debe a que la extracción por HF-LPME no permitió trabajar a niveles más bajos con valores de precisión aceptables ($\text{RSD} \leq 20\%$), aunque este valor también fue finalmente seleccionado por ser el más habitual en aguas de efluente de depuradora²³. Las ventajas e inconvenientes de ambos métodos de extracción se abordan de forma más exhaustiva en el siguiente apartado.

3.4.1 Artículo científico 4

Comparison of solid phase extraction and hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of endocrine disrupting compounds by mass spectrometry and isotope pattern deconvolution

Submitted to Journal of Chromatography A

Fabregat-Cabello, N., Pitarch-Motellón, J., Sancho, J.V., Ibáñez, M. & Roig-Navarro, A.F.

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of Chromatography A
Manuscript Draft

Manuscript Number: JCA-15-729

Title: Comparison of solid phase extraction and hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of endocrine disrupting compounds by mass spectrometry and isotope pattern deconvolution

Article Type: Full Length Article

Keywords: Endocrine Disrupting Compounds; LC-MS/MS; IDMS; Isotope Pattern Deconvolution; Microextraction

Corresponding Author: Dr. A.F. Roig-Navarro, Ph.D

Corresponding Author's Institution: Universitat Jaume I

First Author: Neus Fabregat-Cabello

Order of Authors: Neus Fabregat-Cabello; Jorge Pitarch-Motellón; Juan V. Sancho, Ph.D; María Ibáñez, Ph.D; A.F. Roig-Navarro, Ph.D

Suggested Reviewers: M.A. Bello-López
mabello@us.es
Researcher with enough experience in EDCs determination, MS and microextraction

Kevin Schug
kschug@uta.edu
Researcher with enough experience in EDCs determination, MS and microextraction

Hian Kee Lee
chmleehk@nus.edu.sg
Researcher with enough experience in EDCs determination, MS and microextraction

Robert Loos
Robert.Loos@jrc.it
Researcher with enough experience in EDCs determination, MS and microextraction

Opposed Reviewers:

Comparison of solid phase extraction and hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of endocrine disrupting compounds by mass spectrometry and isotope pattern deconvolution

Submitted to Journal of Chromatography A

Neus Fabregat-Cabello, Jorge Pitarch-Motellón, Juan V. Sancho, María Ibáñez, Antoni Francesc Roig-Navarro*

Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071, Castellón, Spain.

ABSTRACT

In the present work two different methodologies have been developed and validated for the determination of bisphenol A (BPA), t-octylphenol (OP) and the technical mixture of nonylphenol (NP) in water samples by isotope dilution mass spectrometry and isotope pattern deconvolution. Quantification was performed by ultra high pressure liquid chromatography and tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). For this purpose two extraction methodologies were proposed and compared: a routine extraction methodology based on solid phase extraction (SPE), and a non-conventional technique based on hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME). The sought methodologies were satisfactorily validated in drinking water, surface water and effluent wastewater at two concentration levels, 0.1 and 1 µg/L for alkylphenols and 0.5 and 5 µg/L for BPA. Recoveries within 89-113% and 93-109% were obtained for HF-LPME and SPE respectively, with acceptable coefficients of variation in all cases according to SANCO guidelines. Besides, the use of isotope pattern deconvolution (IPD) calculations permitted to obtain the

concentration of each analyte without the need to perform any calibration curve. Finally, a thorough comparison of both methodologies is included, showing that while HF-LPME provides shorter sample preparation time and overall cost, SPE extraction and manipulation is highlighted by its simplicity.

KEYWORDS: Nonylphenol, Octylphenol, Bisphenol A, Hollow fiber liquid phase microextraction, Isotope pattern deconvolution, LC-MS/MS, water analysis

1. INTRODUCTION

Endocrine Disrupting Compounds (EDC) is a group of exogenous organic compounds that are able to interfere with the normal function of the endocrine system. These compounds are qualified as “contaminants of emerging concern” by the U.S. EPA because their presence, occurrence or sources, are unknown [1]. Despite most of these compounds are included in the main international aquatic regulations [2,3], there is still no regulatory status for some of them. This is mainly a consequence of the limited understanding related to their impact on environment and human health, as in the case of bisphenol A.

Among the different sources of EDC, the contamination of the environment (air, water, soil) related to plastics is of increasing concern due to the widespread use and disposal of these materials all over the world. Plastics are supposed to be inert materials that cannot interact with cells due to their large molecular size. Nevertheless, they are able to adsorb, transport and also release, when degraded or leached, smaller molecular compounds [4]. As a consequence, and among others, phenol derivatives are released during all the water cycle [5], including those of increasing concern such as bisphenol A, octylphenol and nonylphenol. These compounds can eventually reach the trophic chain and disrupt the endocrine system of higher consumers.

Bisphenol A (BPA) is a monomer mainly used during the synthesis of polycarbonate plastics and epoxy resins [6]. Alkylphenols are mainly employed

for producing alkylphenol ethoxylates, a surfactant additive widely employed in the manufacture of a variety of detergents and plastic products. Nowadays, over the 80% of the global production of alkylphenols corresponds to nonylphenol mixtures (NP) while the other 20% corresponds to t-octylphenol (OP) [7].

When analyzing EDCs at ultratrace levels in water samples, a preconcentration step is mandatory. For this reason, a wide variety of preparation techniques have been applied for the extraction and enrichment of the target compounds [5,8–10]. Despite the main current extraction trends are the miniaturization, automatization and green-chemistry related approaches, conventional procedures such as liquid-liquid extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE) are still the most common in routine laboratories [10]. Nevertheless, new extraction methodologies, which avoid the use of large solvent volumes and reduce the sample treatment, are being constantly developed. The most common microextraction techniques are stir bar sorptive extraction (SBSE) [11], and solid phase microextraction (SPME) both, in classical PDMS fibers or with the recently proposed use of polyethersulfone (PES) SPME tubes, which increases the extraction rate compared with previous materials [12]. Alternatively, other relatively new extractions procedures have been applied for the extraction of EDCs, which include thin-film microextraction (TFME) [13], hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) [14] or membrane assisted solvent extraction (MASE) [9].

The determination of EDCs has been described using either high (or ultra high)-performance liquid chromatography (HPLC) or gas chromatography (GC)-based methods, mostly combined with mass spectrometry (MS) detectors. At the present, ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) with tandem mass spectrometry (MS/MS) is normally preferred over GC since it provides faster separations and is also able to achieve the sensitivity and selectivity required. Besides, UHPLC-MS/MS also avoids the need to perform any derivatization steps. Nevertheless, the great majority of

miniaturized extraction techniques are combined with GC techniques. There are only a few exceptions using microextraction techniques together with LC-MS, which include the use of ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction (DLLME) [15] and, to a lesser extent, HF-LPME [16]. It has to be pointed out that the main drawback of this hyphenated technique is its interface, normally an electrospray ionization source (ESI), which tends to suffer from matrix effects [17,18] leading to inaccurate quantifications. Matrix effects can be compensated by different approaches. The most accurate way to deal with these modifications during signal acquisition is by the addition of their corresponding isotopically labelled internal standard (IL-IS), as they present the same ionization behaviour as analytes [19]. When selecting an IL-IS, ^{13}C or ^{15}N labelling is preferred over deuterium labelling since chromatographic isotopic effects are common in the latter case [18].

The aim of the present study was to develop a rapid method for the extraction of NP, (OP) and BPA in water samples by means of HF-LPME and its reliable quantification by UHPLC-MS/MS. Also, a standard SPE was optimized for validation and comparison purposes. On the other hand, a quantification method based on IDMS has been developed, using the corresponding isotopically ^{13}C -labeled analogues of each target analyte, thus correcting the matrix effect. In order to reduce the total analysis time the quantification was carried out by using isotope pattern deconvolution (IPD), which avoids the use of calibration curves. Previously to method development, a thorough study of all contamination sources has been performed.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents and materials

Bisphenol A (BPA, purity 98.5%) was provided by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany), 4-tert-octylphenol (OP, purity 99.0%) by Supelco (Bellefonte, PA, USA) and technical nonylphenol (NP, Pestanal, purity 95.4%) from Riedel de Haen (Seelze, Germany)). In-house synthesized $^{13}\text{C}_1$ -4-(3,6-dimethyl-3-heptyl)phenol ($^{13}\text{C}_1$ -NP) (purity 99% and $^{13}\text{C}_1$ -enrichment 98%) and $^{13}\text{C}_1$ -4-tert-octylphenol ($^{13}\text{C}_1$ -OP) (purity 99% and $^{13}\text{C}_1$ -enrichment 99%) were also employed [16,20]. Alternatively, $^{13}\text{C}_{12}$ -bisphenol A (purity 98% and $^{13}\text{C}_{12}$ -enrichment 99%) used was from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). Table 1 shows the molecular formula of the selected compounds.

Methanol, acetone, and acetonitrile (minimum HPLC quality) were provided by Scharlau (Barcelona, Spain). For the extraction, 1-octanol (reagent grade, 99%) was obtained from Sigma-Aldrich Co. (Madrid, Spain). The pH of the mobile phase was adjusted by adding ammonium hydroxide from Fluka (Buchs, Switzerland). Bottled drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) flasks was also employed for validation purposes.

Individual stock solutions of alkylphenols and BPA were prepared by dissolving 50 mg, accurately weighted, in 50 mL of methanol. Since $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA was purchased as a 1.2 mL solution of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in acetonitrile, stock solution was prepared by dilution until 25 mL with methanol. This provided a concentration by reverse isotope dilution against the natural composition compound of 6.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The same procedure was applied to calculate the exact concentrations of labeled stocks solutions, obtaining 15.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $^{13}\text{C}_1$ -NP and 10.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for $^{13}\text{C}_1$ -OP.

An intermediate mixed solution of OP, NP and BPA at a concentration of 0.2, 0.2 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was prepared after mixing individual stock solution and dilution with methanol. Similarly, a labeled mix solution of the ^{13}C compounds

was prepared at the same concentration level. For validation purposes, a lower concentration solution was prepared by a ten-fold dilution with methanol. All standard solutions were stored in amber glass bottles at -20°C in a freezer.

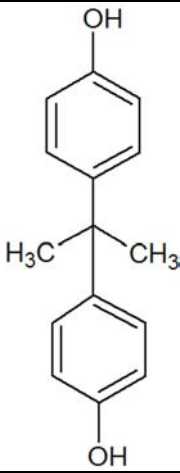
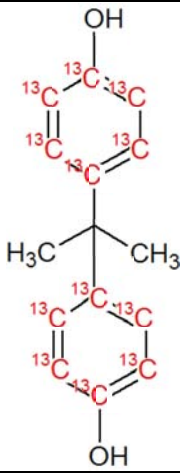
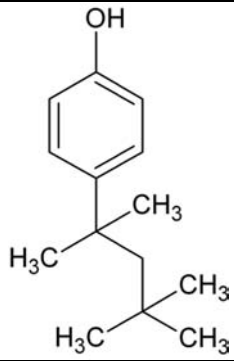
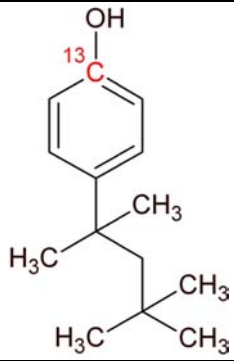
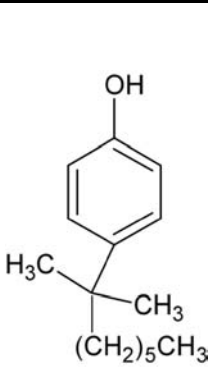
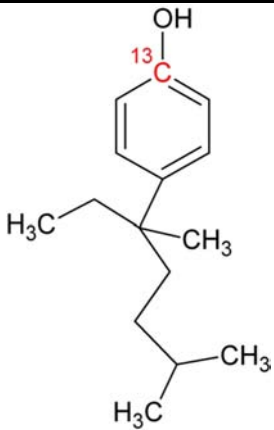
The Accurel® Q3/2 polypropylene (PP) hollow fibers (600 µm i.d., 200 µm wall thickness and 0.2 µm pore size) were obtained from Membrana (Wuppertal, Germany). Cartridges used for SPE were C18 glass SPE tube ENVI-18 (500mg /6mL), PTFE SPE Tube Adapter (with female luer port), 30 mL glass syringe used as well as load reservoirs were all from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

The water purification system used was Milli-Q gradient A10 with an EDS-Pak polisher (Millipore, Bedford, MA, USA). The EDS filter enables the removal of endocrine disruptors in ultrapure water. Certified polypropylene bonded caps with PTFE/red rubber septum from Supelco (Bellefonte, PA, USA) were employed for the LC vials.

2.2 Instrumentation

An Acquity UPLC system (Waters Corp., Milford, MA, USA) coupled to a TQD (triple quadrupole) mass spectrometer was employed for sample analysis. Chromatographic separation was performed with an Acquity UPLC HSS T3 column 1.8 µm, 2.1 mm x 100 mm (i.d.) (Waters) at a flow rate of 0.3 mL/min and the injection volume was 20 µL. The column was kept at 40 °C and the sample manager was maintained at 5 °C. The separation was performed under isocratic conditions with a mobile phase consisted of 97% methanol/water with 0.01% ammonia. Due to the expected volatility losses of NH₃ dissolved in methanol, mobile phase was daily prepared.

Table 1. Studied analytes including CAS number, chemical structures and log Kow.

Analyte (CAS number)	Chemical structure	Internal standard	Log Kow
Bisphenol A (BPA) (80-05-07)			3.32
4-tert-Octylphenol (OP) (140-66-9)			4.12
Technical Nonylphenol (NP) (25154-52-3, 84852-15-3)			4.48

Research paper 4

Analysis was performed according to the following parameters: capillary voltage 3.30 kV, source and desolvation temperatures at 120 and 350 °C, cone gas and desolvation flow were set at 80 and 800 L/h. The mass spectrometer was operated in negative mode electrospray ionization in selected reaction monitoring (SRM) mode. MS/MS experimental conditions for the selected compounds are shown in Table 2. Drying as well as nebulizing gas was nitrogen, obtained from a nitrogen generator N₂ LC-MS adapted for LC-MS analyzers (Claind, Teknokroma, Barcelona, Spain). For operation in MS/MS mode, collision gas was Argon 99.995% (Praxair, Madrid, Spain) with a pressure of approximately 4·10⁻³ mbar in the collision cell. Dwell times of 0.1 s/scan were chosen. MassLynx v4.1 (Waters) software as well as homemade excel spreadsheets were used to process the quantitative data obtained.

Table 2. Experimental conditions of the UHPLC-MS/MS for the selected compounds

Compound	Ret. Time (min)	Cone voltage (V)	Ion-ratio transitions ¹ Native compound	SRM transitions Isotopic label	SRM transitions IPD
Bisphenol A (BPA)	0.85	30	227.2 > 212.1 (15) 227.2 > 133.0 (20)	239.2 > 224.1(15) ¹³ C ₁₂ -BPA	227.2 > 212.1 (15) 228.2 > 213.1 (15) 239.2 > 224.1(15)
Octylphenol (OP)	1.15	30	205.2 > 133.0 (25) 205.2 > 117.1 (45)	206.2 > 134.0 (25) ¹³ C ₁ -OP	205.2 > 133.0 (25) 206.2 > 134.0 (25) 207.2 > 135.0 (25)
Nonylphenol (NP)	1.27	30	219.2 > 133.0 (25) 205.2 > 147.1 (25)	206.2 > 134.0 (25) ¹³ C ₁ -NP	219.2 > 133.0 (25) 220.2 > 134.0 (25) 221.2 > 135.0 (25)

¹Information in brackets: Collision energy (eV), bold = Quantifier; IPD: Isotope Pattern Deconvolution.

2.3 Preparation of water samples

Environmental samples with observable suspended particulate matter were decanted by pouring the water after sedimentation slowly from the sample bottles into clean 1 L glass (Schott-Duran) bottles [21]. Then, 0.5 mL of the labeled mixture solution was added to a 100-mL volumetric flask, where the water sample was used to fill it and to adjust the final volume. This gives a final concentration of 0.1 µg/L except for $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA which was 0.5 µg/L. Accurate and precise results will be obtained when the ratio of concentrations between the natural and labeled compound is in the range of 0.1 to 10, according to the random error propagation theory [22].

2.4 Recommended Hollow fiber extraction procedure

Fibers were cut into 13 cm long pieces and cleaned by means of sonication (15 min in methanol followed by 15 min in acetone) and soaked with 1-octanol for 5 seconds in order to impregnate the pores of the hollow fibers. Then the excess of 1-octanol on the outside was removed by washing the fiber 25 seconds in stirred bottled water. The lumen of the hollow fiber was filled with 30 µL of the acceptor phase, 1-octanol, using a 100-µL HPLC microsyringe model 701N (outer diameter 0.72 mm) from Hamilton (Bonaduz, Switzerland) and both open ends of the fiber were closed by means of a hot soldering tool. Then, fibers were held by a stainless steel alligator clip holder attached to a wire and immersed into a 100 mL water sample. Extraction was performed during 30 min at 800 rpm. After extraction, the acceptor was transferred from the fiber into a HPLC vial flushing with 270 µL of methanol using a HPLC gastight syringe model 1001 (outer diameter 0.72 mm) from Hamilton (Reno, Nevada, USA). Before injection into the HPLC system, samples were homogenized by agitation in a vortex during 5 seconds.

2.5 Solid phase extraction procedure

SPE was performed using Supelclean ENVI-C18 glass cartridges that were conditioned by washing and rinsing with 2mL of methanol, 2mL of acetonitrile

and 2 mL of bottled water. Then, after introducing around 4 mL of water samples, a PTFE adapter was stacked to a 30 mL syringe barrel to act as a larger loading reservoir. One hundred mL water samples were percolated through the cartridges by gravity, and then cartridges were vacuum dried for 30 min. Analytes were eluted using 5 mL of acetonitrile. The extracts were evaporated to dryness at 40 °C under a gentle stream of nitrogen and reconstructed in 0.5 mL of methanol.

2.6 Cleaning procedure

The ubiquitous presence of the selected compounds in all the laboratory material, included solvents, is probably the main challenge during the determination of EDCs at very low concentration levels. For this reason, and according to our previous experience [16,20], all glass material was rinsed with acetone, methanol and hexane. Compared with previous works, rinsing also with hexane was added to the cleaning procedure due to some contamination observed after rinsing only with the other two solvents.

On the other hand, both hollow fibers and magnetic stirrers were rinsed with acetone and sonicated 15 min in methanol and 15 min in acetone before use. HPLC syringes were rinsed twice with acetone and twice with methanol between samples. Due to their low cost, fibers were discarded after being used to decrease memory effect and cross-contamination.

2.7 Determination of EDC by Isotope Pattern Deconvolution

The isotope dilution calculation methodology applied in this work is based on the combination of multiple linear regression and the use of labeled ¹³C-analogues of each analyte. Briefly, this approach assumes that the final isotopic composition observed in the mixture, A_{mix}^{SRMi} , is a combination of the contribution of the abundances of the analyte, A_{nat}^{SRMi} , and those of the

isotopically enriched spike, A_{lab}^{SRMi} [23–25]. This can be better described in matrix notation as can be observed in Equation 1.

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{SRM1} \\ A_{mix}^{SRM2} \\ A_{mix}^{SRM3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{SRM1} & A_{lab}^{SRM1} \\ A_{nat}^{SRM2} & A_{lab}^{SRM2} \\ A_{nat}^{SRM3} & A_{lab}^{SRM3} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{SRM1} \\ e^{SRM2} \\ e^{SRM3} \end{bmatrix} \quad (1)$$

As can be seen in Equation 1, an error vector, e^{SRMi} , needs to be included in order to resolve the system of equations, since a minimum of three SRM have to be employed. The solutions to Equation 1 correspond to the molar fractions of natural and labeled compounds in the mixture, X_{nat} and X_{lab} . These can be obtained by using conventional spreadsheet software (e.g. LINEST function of Microsoft Excel). Finally, the amount of natural abundance compound, N_{nat} , can be directly calculated using Equation 2 since the added amount of labeled standard, N_{lab} , is known.

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{X_{nat}}{X_{lab}} \quad (2)$$

Consequently, quantification of EDC avoids the need to carry out any methodological calibration curve. It must be pointed out that the theoretical mass isotopomer distribution coming from each precursor ion have to be obtained and compared with those obtained experimentally. This can be easily carried out by using the software *Isopatrn* implemented by L. Ramaley et al. [26]

Finally, confirmation of the presence of the selected compounds was carried out by calculating the peak area ratios between the qualifier (q), and the quantifier transition (Q) and comparing them with ion-ratios from a reference standard (See Figure 1).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Optimization of the chromatographic conditions

The proposed LC method was optimized to provide a simple and fast separation of BPA, OP and NP. In a first approach, gradient conditions using C18 columns were tested since are known for providing better peak shapes and increasing retention for the less apolar compounds. On the basis of the gradient conditions used by Jing et al. [27], different combinations methanol-water were studied. Bearing in mind the high levels of EDCs usually contained in Milli-Q grade water [28,29], it was passed through an extra purification system, an EDS polisher. Nevertheless, even using treated MilliQ water, nonylphenol was accumulated during gradient injection cycles. As a consequence gradient conditions were finally discarded.

Therefore, the isocratic conditions were also tested. Based on our previous works [16,20] different percentages of methanol-water combinations, with and without ammonia and ammonium acetate as modifiers, were evaluated. The best sensitivity was reached with a mobile phase consisted of 97% methanol/water with 0.01% ammonia since the presence of NH₄Ac affected negatively the signal of BPA. In these conditions, the signal enhancement of NP and OP in methanol extracts when combined with octanol extracts was not observed as occurred in previous works [16]. On the other hand, it has to be highlighted that the chromatographic run was reduced to only 2 min, decreasing considerably the analysis time compared with previous developed methodologies [5,12,30]. Last but not least, and as stated before, these conditions avoid problems of inaccuracy between injections compared with previous developed methodologies using gradient conditions [12]. A chromatogram under these conditions can be consulted in Figure 1.

3.2 Measurement of the isotopic composition of $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA by LC-MS/MS

As stated above, the correct quantification via IPD equations require the accurate knowledge of the relative abundances of both natural and isotopically labeled compounds. For this reason, abundances were experimentally measured for each analyte (both natural and labeled) by preparing individual 500 $\mu\text{g/L}$ standards in methanol and injecting each five times which the appropriate SRM transitions.

In LC-MS/MS, the occurrence of different fragmentation mechanisms may occur simultaneously in the collision cell, and fragment ions containing different number of hydrogen atoms can overlap in the mass spectrum [31,32]. As a consequence, the purity of the selected cluster must be evaluated, following the procedure described in previous works [16,20]. It was observed that the major contribution in selected compounds corresponded to clusters $[\text{M}-\text{H}]^-$ and $[\text{M}-2\text{H}]^-$. The values obtained for NP were a contribution of 96.0 ± 0.3 for $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{14}]^-$ and 4.0 ± 0.3 % for $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{15}]^-$ while for OP of 98.10 ± 0.13 for $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{12}]^-$ and 1.9 ± 0.13 % for $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{13}]^-$. In the case of BPA, the observed contributions were 88.2 ± 0.3 for $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_3]^-$ and 11.8 ± 0.3 % for $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_4]^-$. These contributions were included in the matrix of abundances used for IPD calculations.

3.3 Concentration and extend of ^{13}C -enrichment of the $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA standard

In order to apply IPD calculations, it is mandatory to know the exact amount of each labeled compound added to the sample. For this reason, the concentration of $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA was calculated against its corresponding reference natural analogue. Under these circumstances, we obtained a concentration of 6.18 ± 0.09 $\mu\text{g/mL}$. The isotopic enrichment of ^{13}C was found to be 99.0% calculated according to the method described elsewhere [20] and matched with the nominal enrichment provided by the manufacturer.

3.4 Optimization of the HF-LPME experimental parameters

The efficiency of the current procedure was examined by studying extraction solvent and time, maintaining a fix stirring speed at 800 rpm. This agitation rate was selected since it was the biggest value that did not originate a vortex in the sample solution. Other parameters, including the extraction pH and amount of sodium chloride added to the sample solution were not evaluated since they have normally a low or negative influence [16,33].

Selection of the acceptor solvent was performed with octanol, diethyl ether and toluene by extracting the target compounds in water samples during 30 min. Among them, octanol was preferred due to their high partition coefficient water-octanol for the selected compounds (See Table 1). For each solvent, a triplicate of 100 mL of Milli-Q water fortified with the three compounds at a concentration level of 5 µg/L plus a blank sample were evaluated. Negligible recoveries were obtained for both diethyl ether and toluene. Thus, octanol has been chosen as acceptor phase. This solvent has the advantage of being compatible with the chromatographic conditions when diluted in methanol, simplifying the sample treatment procedure.

Finally the influence of extraction time was also tested. For this study, water samples were extracted under the optimized conditions for 15, 30 and 45 min. It was observed that 30 min provided the highest enrichment (preconcentration) factors for the three compounds in the octanol extracts: around 300 for BPA, 500 for OP and 400 for NP [14]. However, in terms of absolute recoveries, the values for the three compounds were 10% for BPA, and 15% for OP and 12% for NP.

3.5 Optimization of the SPE experimental parameters

Considering problems reported in previous publications [10,20] as well as possible contamination, C18 glass tube cartridges were selected due to their ability to retain non-polar compounds. The optimization was performed

evaluating four different elution solvents (methanol, acetonitrile, acetone and hexane) and collecting two consecutive fractions of 5 mL for each solvent. Then, each fraction was evaporated with a gentle stream of N₂ and finally reconstituted in 0.5 mL of methanol. The best results were obtained using 5 mL of acetonitrile as elution solvent, which provided absolute recoveries of 78%, 68% and 59% for BPA, OP and NP, respectively.

3.6 Performance of the analytical methods: SPE vs HF-LPME

Once the SPE procedure and the HF-LPME parameters were optimized, the method validation was carried out. As no certified reference material was available for the target compounds, different spiked water samples were used to obtain the recoveries and relative standard deviation (RSD) of the method. Three types of water samples were evaluated, bottled water, surface water and effluent wastewater, at two concentration levels, 0.1 and 1 µg/L for alkylphenols and 0.5 and 5 µg/L for BPA. Compared to OP and NP, the BPA levels were increased due to the high RSD obtained for HF-LPME in preliminary experiments. For each combination matrix-validation level, four independent replicates were analyzed within a day and injected in duplicate.

“Blank” water samples of each matrix spiked only with the isotope labeled mixture were also processed to subtract the endogenous amount of the target compounds. As an example of the method performance Figure 1 illustrates the detection and confirmation of the selected compounds in a surface water sample. Since no real sample blank was found for any of the studied matrices, the subtraction of the blank values from fortified samples resulted in higher errors in the recovery calculation. As can be observed in Table 3, this mostly affected the lowest validated level, especially for NP as higher blank levels were found.

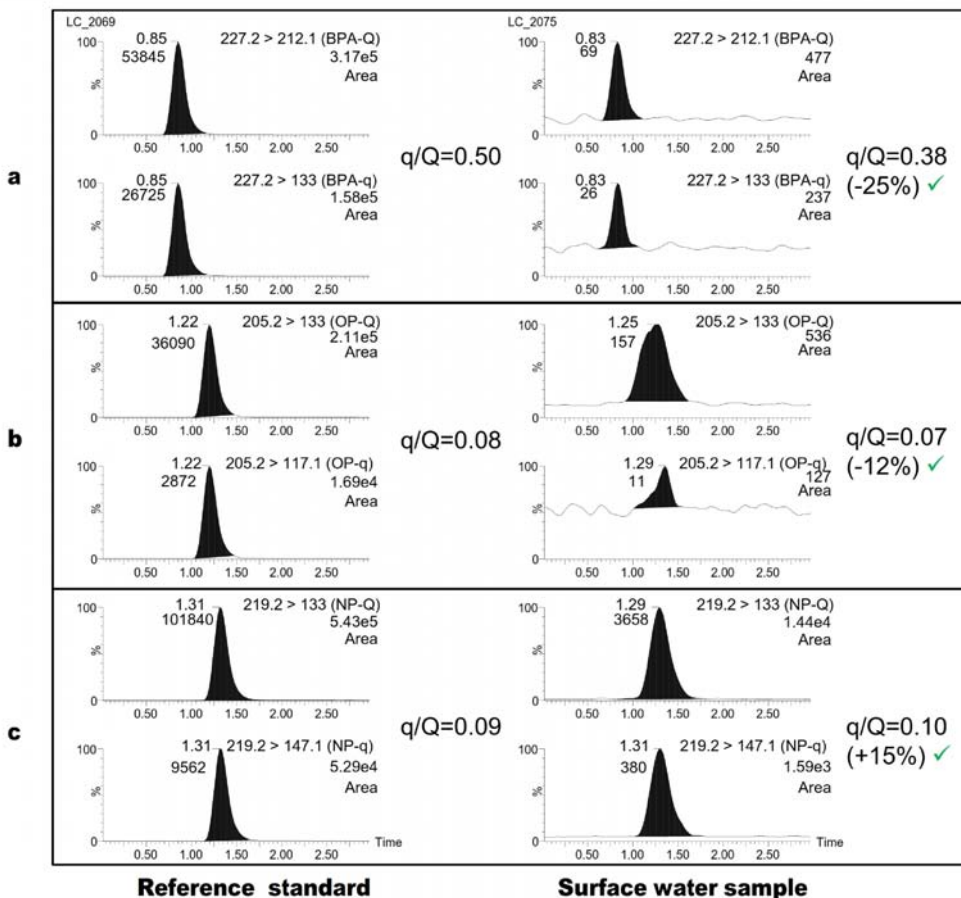


Figure 1. UHPLC–MS/MS chromatograms of BPA (a), OP (b) and NP (c) for reference standards (left) and for a positive surface water sample by HF-LPME.

The results obtained were satisfactory for BPA, OP and NP in all water samples, with recoveries between 89% and 113% for HF-LPME, and between 91% and 113% with SPE. RSDs were below 17% in HF-LPME while SPE presented a maximum of 16% (Table 3). These values agreed with the SANCO guideline SANCO/12571/2013 [34] which proposes $RSD \leq 20\%$ and recoveries between 70% and 120%. In both cases, the highest RSDs corresponded to NP at the lowest validated level, probably caused by the highest error with the

subtraction of its concentration in blank samples. Consequently, the extraction methodologies developed were satisfactorily validated in all matrices.

The limit of quantification (LOQ) objective was established as the lowest validated level for all compounds, which was in agreement with actual EU directive for waters for NP (0.3 ng/mL) and OP (0.1 ng/mL) [2]. As stated before, maximum levels of BPA in water are not established in any legislation. For the measurements, the labeled compounds, $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA, $^{13}\text{C}_1$ -OP, $^{13}\text{C}_1$ -NP, were added at the same concentration level as the added natural compounds. Figure 2 shows that both the single labeled and the uniformly labeled internal standards coeluted with their natural analogues, thus no chromatographic isotopic effects were observed, making them able to correct any possible matrix effects [17,35].

The analytical characteristics of both extraction techniques in terms of time, cost, total volume consumption and handling were also compared.

On the one hand, the selected miniaturized extraction, HF-LPME, has the main advantage of the very low cost of each extraction fiber (approximately around 0.03 euro) and allows an average of 9 extractions in 2 hours (with the magnetic stirring set of 9 plates used in the present work. See Figure S1). Thus, around 13 minutes are needed per sample extracted. Besides, only 300 μL of solvent are employed, which is in line with green chemistry tendencies. Nevertheless, the preparation of hollow fibers and consequent withdrawal of the acceptor solvent after extraction requires practice, and its manipulation is sometimes complicated. This could be an added difficulty to its application in routine laboratories despite of the economic advantages.

Alternative, the SPE technique, in the off-line version used in this work (12 position), is a very simple, transferable and accurate extraction methodology. Despite the high price per SPE glass cartridge (around 7 euros each), higher volume consumption (9.5 mL of organic solvents per sample) and longer sample treatment time, this approach can be much easier applied.

Nevertheless is a tedious extraction and permits, approximately, a maximum of 20 extracted samples per 8h-working day, what makes an average time of 24 minutes per sample. It has to be pointed out that if only 10 samples are extracted, the total time per sample will be increased, making it a laborious procedure.

Confirmation of possible findings was carried out by calculating the peak area ratios between the confirmation transition (underneath the quantifier transition in Table 2) and the quantifier (in bold in the same Table) and by comparing them with the ion-ratio calculated from a reference standard (Figure 1). Maximum deviations accepted in q/Q ratios were based on guideline SANCO/12571/2013 [34], where a maximum of 30% is established. A notorious improvement in this work compared with previous literature is the possibility of confirming positive findings of OP due to improved signal sensitivities [16]. Besides, it was possible to reduce the sample volume from 200 mL to 100 mL in the SPE extraction [20].

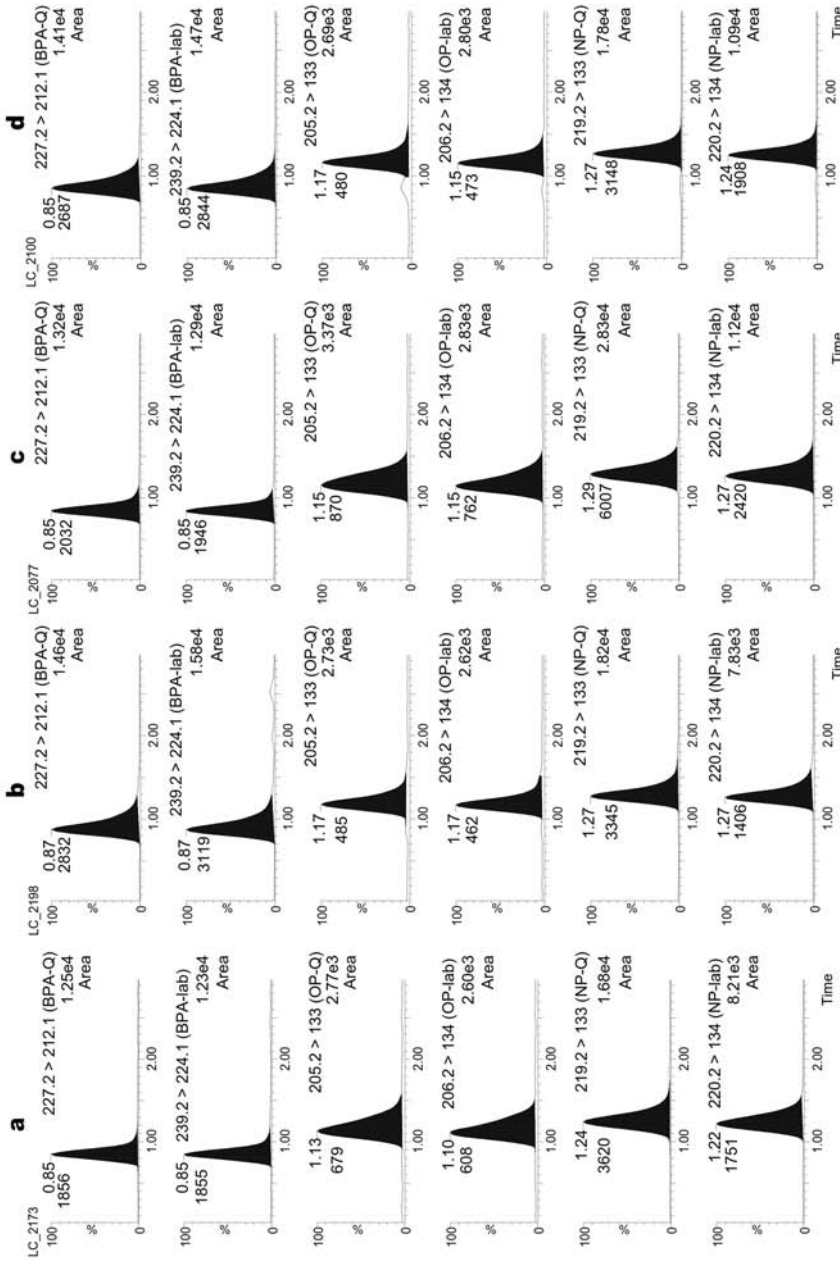


Figure 2. SRM chromatograms in negative electrospray ionization for bisphenol A (BPA), octylphenol (OP) and nonylphenol (NP) in effluent wastewater by (a) HF-LPME and (b) SPE as well as in surface water by (c) HF-LPME and (d) SPE at the lowest validated level

Finally, all SRM transitions, employed for IPD calculations as well as the confirmation transitions for BPA, OP and NP, could be acquired simultaneously at this low level for all analytes. This makes possible to quantify and confirm the selected analytes with a high level of confidence in a single injection.

Table 3. Recovery for bisphenol A (BPA), 4-tert-octylphenol (OP) and technical nonylphenol (NP) in bottled water, effluent wastewater and surface water obtained by isotope pattern deconvolution calculations. Extractions by HF-LPME and SPE are include for each water sample.

Compound	Validation level	Bottled water		Effluent wastewater		Surface water	
		HF-LPME	SPE	HF-LPME	SPE	HF-LPME	SPE
Bisphenol A	LOQ	104 ± 14	93 ± 3	102 ± 14	93 ± 8	104 ± 7	96 ± 3
	10 LOQ	98 ± 8	94.1 ± 1.2	100 ± 8	101.6 ± 2.3	99 ± 11	107 ± 3
Octylphenol	LOQ	105 ± 10	105 ± 7	100 ± 11	104 ± 8	96 ± 15	109 ± 7
	10 LOQ	100.7 ± 1.3	101.9 ± 1.4	99.5 ± 1.5	100 ± 3	102 ± 4	97 ± 4
Nonylphenol	LOQ	109 ± 17	97 ± 16	89 ± 14	113 ± 13	94 ± 15	91 ± 15
	10 LOQ	107.6 ± 2.4	103 ± 8	113 ± 9	103 ± 8	111 ± 9	102 ± 8

^aThe uncertainty of the values corresponds to 1s standard deviation of four independent replicates injected two times each.

4. CONCLUSIONS

In this work, a HF-LPME method by UHPLC-MS/MS has been demonstrated to be suitable for simultaneous determination of BPA, OP and NP with high sensitivity, high enrichment factors and good sample clean-up ability. Besides, compared with previous developed methodologies [14] no derivatization step is required and analytes can be separated in a 2-minutes run. In addition, the proposed extraction procedure is performed in only 30 min, which is a great advantage compared with other microextraction techniques which normally require longer extraction times [11,12].

Regarding quantification, IPD calculations have been proven trustworthy and fast, providing one result per sample injection. Quantification, based in IDMS through ^{13}C -labeled compounds and multiple linear regression has the advantage that methodological calibration curves are no longer needed, thus reducing the total analysis time.

Comparable results in terms of precision and accuracy have been observed in both extraction methodologies tested, classical SPE and HF-LPME. In the case of extraction by disposable hollow-fibers with octanol as acceptor phase, it has been proved to be a fast, inexpensive, precise and sensitive analytical procedure. Nevertheless, it could be difficult to manipulate the fibers before and after the extraction and this must be a key point when applying this procedure in routine laboratories. Also, and despite of the high enrichment factors obtained, absolute recoveries are still very low.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the financial support from Generalitat Valenciana (Research group of excellence Prometeo 2009/054 and Collaborative Research on Environment and Food Safety ISIC/2012/016), as well as University Jaume I for the project PB1- 1B2013-55. N.Fabregat-Cabello also acknowledges the Generalitat Valenciana for her Ph.D. research grant under the Program VALi+D. Finally the authors are grateful to the Serveis Centrals d'Instrumentació Científica (SCIC) of University Jaume I for using Acquity and TQD instruments.

REFERENCES

- [1] T. Deblonde, C. Cossu-Leguille, P. Hartemann, , *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 214 (2011) 442–448.
- [2] Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, 2013.
- [3] U.S. Environmental Protection Agency (EPA), National Recommended Water Quality Criteria:
<http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/current/index.cfm#cmc> (accessed 27 April 2015)
- [4] E.L. Teuten, J.M. Saquing, D.R.U. Knappe, M. a Barlaz, S. Jonsson, A. Björn, et al., , *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364 (2009) 2027–2045.
- [5] H.W. Chen, C.H. Liang, Z.M. Wu, E.E. Chang, T.F. Lin, P.C. Chiang, et al., *Sci. Total Environ.* 449 (2013) 20–28.
- [6] W. V Welshons, S.C. Nagel, F.S. vom Saal, *Endocrinology.* 147 (2006) S56–69.
- [7] R. Loos, J. Wollgast, J. Castro-Jiménez, G. Mariani, T. Huber, G. Locoro, et al., *Trend. Anal. Chem.* 27 (2008) 89–95.
- [8] A.D. LaFleur, K. a Schug,, *Anal. Chim. Acta.* 696 (2011) 6–26.
- [9] A Iparraguirre, P. Navarro, R. Rodil, a Prieto, M. Olivares, N. Etxebarria, et al., *J. Chromatogr. A.* 1356 (2014) 163–170.
- [10] H.G. Mol, S. Sunarto, O.M. Steijger, *J. Chromatogr. A.* 879 (2000) 97–112.
- [11] S. Nakamura, S. Daishima *J. Chromatogr. A.* 1038 (2004) 291–294.
- [12] O. Ros, a. Vallejo, L. Blanco-Zubiaguirre, M. Olivares, a. Delgado, N. Etxebarria, et al., *Talanta.* 134 (2015) 247–255.
- [13] M. Sun, Q. Wu, C. Wang, Z. Wang, *Anal. Methods.* 6 (2014) 6316–6321.
- [14] C. Basheer, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A.* 1057 (2004) 163–169.
- [15] N. Salgueiro-González, E. Concha-Graña, I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A.* 1223 (2012) 1–8.
- [16] N. Fabregat-Cabello, J. V Sancho, A. Vidal, F. V González, A.F. Roig-Navarro, *J. Chromatogr. A.* 1328 (2014) 43–51.
- [17] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, *Talanta.* 115 (2013) 104–122.
- [18] H. Truffelli, P. Palma, G. Famiglioni, A. Cappiello, S. Geologiche, T. Chimiche, et al., *Mass. Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491–509.

- [19] P. Rodríguez-González, J.M. Marchante-Gayón, J.I. García Alonso, A. Sanz-Medel, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 60 (2005) 151–207.
- [20] N. Fabregat-Cabello, Á. Castillo, J. V. Sancho, F. V. González, A.F. Roig-Navarro, *J. Chromatogr. A.* 1301 (2013) 19–26.
- [21] R. Loos, G. Locoro, S. Contini, *Water Res.* 44 (2010) 2325–2335.
- [22] J.I. García Alonso, *Anal. Chim. Acta.* 312 (1995) 57–78.
- [23] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, *Analyst.* 135 (2010) 953–964.
- [24] J. Meija, L. Yang, J. a. Caruso, Z. Mester, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 1294–1297.
- [25] P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 25 (2010) 239–259.
- [26] L. Ramaley, L. Cubero Herrera, *Rapid Commun. Mass Sp.* 22 (2008) 2707–2714.
- [27] X. Jing, S. Bing, W.U. Xiaoyan, S.U.N. Xiaojie, W.U. Yongning, *Biomed. Environ. Sci.* 24 (2011) 40–46.
- [28] M.-H. Dévier, K. Le Menach, L. Viglino, L. Di Gioia, P. Lachassagne, H. Budzinski, *Sci. Total Environ.* 443 (2013) 621–632.
- [29] M. Kawaguchi, R. Ito, N. Okanouchi, K. Saito, H. Nakazawa, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 870 (2008) 98–102.
- [30] J. Wang, W.C. Schnute, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2605–2610.
- [31] J. Meija, J. a Caruso, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 15 (2004) 654–658.
- [32] M. Fernández-Fernández, A. González-antuña, P. Rodríguez-gonzález, M.E. Añón, F. V Álvarez, J.I. García Alonso, *Clin. Chim. Acta.* 431 (2014) 96–102.
- [33] M. Villar-Navarro, M. Ramos-Payán, R. Fernández-Torres, M. Callejón-Mochón, M.Á. Bello-López, *Sci. Total Environ.* 443 (2013) 1–6.
- [34] Document No. SANCO/12571/2013; Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed 19.11.2013, (2014).
- [35] H. Trufelli, P. Palma, G. Famigliani, A. Cappiello, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491–509.

3.5 Bibliografía

1. Colborn, T. & Clement, C. *Chemically Induced Alterations in Sexual Development: The Wildlife/Human Connection*. (Princeton Scientific Publishing Co., 1992).
2. Heindel, J. J., Jobling, S., Kidd, K. A. & Zoeller, R. T. *Endocrine Disrupting Chemicals - 2012*. (World Health Organization, 2012).
3. Sosa-Ferrera, Z., Mahugo-Santana, C. & Santana-Rodríguez, J. J. Analytical methodologies for the determination of endocrine disrupting compounds in biological and environmental samples. *Biomed Res. Int.* **2013**, 1–23 (2013).
4. Rahman, M. F., Yanful, E. K. & Jasim, S. Y. Endocrine disrupting compounds (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the aquatic environment: implications for the drinking water industry and global environmental health. *J. Water Health* **7**, 224–243 (2009).
5. *Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.* **2013**, (2013).
6. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). National Recommended Water Quality Criteria. at <http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/current/index.cfm#cmc>

7. Hernández, F. *et al.* Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal. Bioanal. Chem.* **403**, 1251–1264 (2012).
8. Petrovic, M. & Barceló, D. Application of liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QqTOF-MS) in the environmental analysis. *J. Mass Spectrom.* **41**, 1259–1267 (2006).
9. Chester, T. L. Recent developments in high-performance liquid chromatography stationary phases. *Anal. Chem.* **85**, 579–589 (2013).
10. Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E. & Lester, J. N. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ. Int.* **34**, 1033–1049 (2008).
11. Knepper, T. P., Barceló, D. & Voogt, P. de. *Comprehensive Analytical Chemistry-Analysis and fate of surfactants in the aquatic environment.* (Elsevier Science B.V., 2003).
12. Giger, W., Brunner, P. H. & Schaffner, C. 4-Nonylphenol in sewage sludge: Accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science.* **225**, 623–625 (1984).
13. Parliament, T. H. E. E., Council, T. H. E., The, O. F. & Union, E. *DIRECTIVE 2003/53/EC.* (2003).
14. Giger, W., Gabriel, F. L. P., Jonkers, N., Wettstein, F. E. & Kohler, H.-P. E. Environmental fate of phenolic endocrine disruptors: field and laboratory studies. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **367**, 3941–3963 (2009).

15. Rabouan, S. *et al.* Analytical chemistry and metrological issues related to nonylphenols in environmental health. *Trend. Anal. Chem.* **37**, 112–123 (2012).
16. Gabriel, F. L. P. *et al.* Isomer-specific degradation and endocrine disrupting activity of nonylphenols. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 6399–6408 (2008).
17. Senthil Kumaran, S., Kavitha, C., Ramesh, M. & Grummt, T. Toxicity studies of nonylphenol and octylphenol: hormonal, hematological and biochemical effects in *Clarias gariepinus*. *J. Appl. Toxicol.* **31**, 752–61 (2011).
18. Pedersen-Bjergaard, S. & Rasmussen, K. E. Liquid–Liquid–Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. *Anal. Chem.* **71**, 2650–2656 (1999).
19. Welshons, W. V., Nagel, S. C. & Vom Saal, F. S. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* **147**, 56–69 (2006).
20. Flint, S., Markle, T., Thompson, S. & Wallace, E. Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *J. Environ. Manage.* **104**, 19–34 (2012).
21. US Food and Drug Administration. *Update on bisphenol A for use in food contact applications.* (2010). at
<<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Update+on+Bisphenol+A+for+Use+in+Food+Contact+Applications#0>>
22. European Food Safety Authority (EFSA). No consumer health risk from bisphenol A exposure. at
<<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/150121.htm>>

23. Weltin, D., Gehring, M., Tennhardt, L., Vogel, D. & Bilitewski, B. Occurrence and Fate of Bisphenol A during Wastewater and Sewage Sludge Treatment in Selected German Wastewater Treatment Plants. 1998-2002
24. Esteban, S. *et al.* Monitoring endocrine disrupting compounds and estrogenic activity in tap water from Central Spain. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* (2014).

Capítulo 4

Estudio del efecto matriz y de su corrección en el análisis de micotoxinas



4.1 Introducción

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de ciertas especies fúngicas filamentosas, principalmente del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, sintetizadas después de un tiempo de crecimiento activo o como respuesta a condiciones de estrés. Estos hongos crecen normalmente en alimentos de consumo humano y de animales, tales como forrajes, granos y plantas leguminosas. Pueden originarse antes, durante y después de la cosecha, como resultado de una manipulación o almacenamiento inadecuados, principalmente en países con climas húmedos y cálidos. Como consecuencia de la presencia de estos hongos en piensos, las micotoxinas pueden llegar al ser humano a través de la cadena alimentaria. Carnes, huevos y leche, además de sus derivados, son alimentos típicos donde se encuentran estos contaminantes.

En la actualidad se han descrito más de 300 micotoxinas, aunque sólo unas 30 tienen características tóxicas para los humanos y/o animales. Estos metabolitos forman un grupo de compuestos de bajo peso molecular muy heterogéneo, con estructuras y características físico-químicas y toxicológicas muy distintas entre ellas. A modo de ejemplo, la Figura 4.1 muestra la estructura molecular de 9 micotoxinas seleccionadas. Cabe destacar que a pesar de que todas las micotoxinas tienen origen fúngico, no todos los compuestos generados por hongos se denominan micotoxinas. Por ejemplo, el etanol y la penicilina son sintetizados por hongos pero no son considerados como micotoxinas.

Las micotoxinas no son sólo complicadas de describir sino que también son difíciles de clasificar. En general, las micotoxinas suelen agruparse por sus

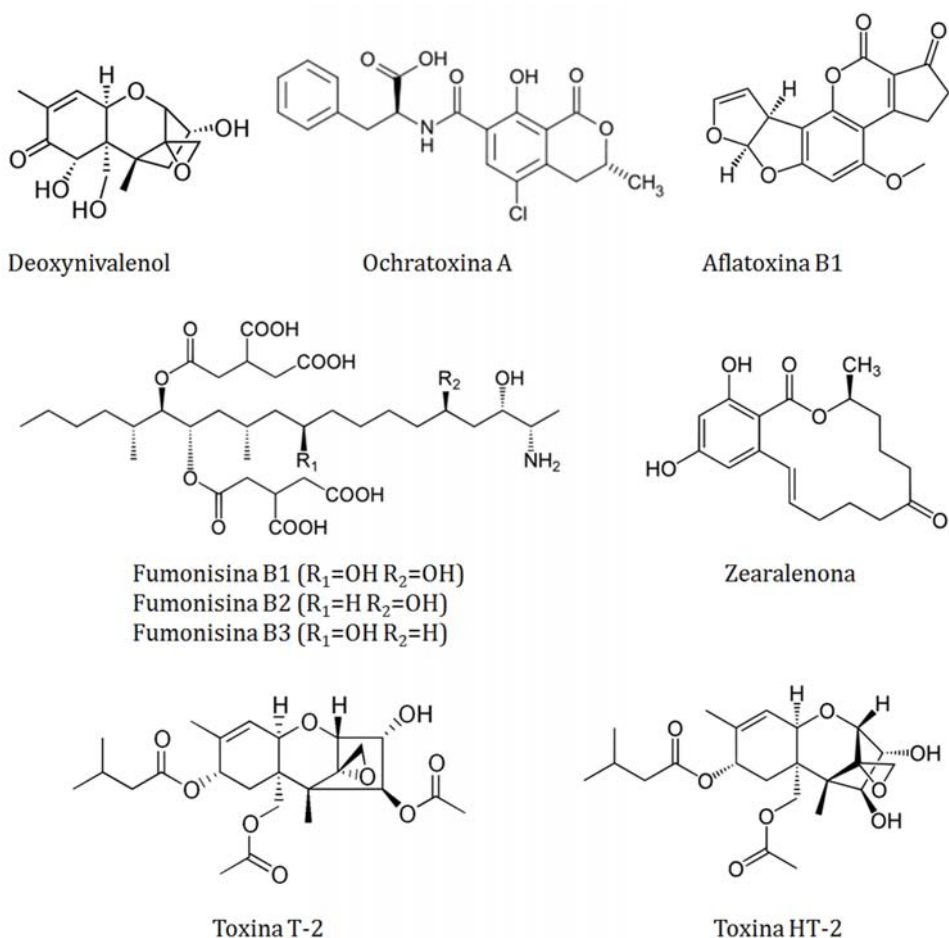


Figura 4. 1 Estructura de las micotoxinas seleccionadas en el presente trabajo.

características toxicológicas, a pesar de que un gran número de micotoxinas muestran características tóxicas superpuestas¹. No obstante, en la actualidad aún no existe un consenso general sobre su clasificación.

El término micotoxina fue acuñado en 1962 tras la muerte de 100.000 pavos cerca de Londres (Inglaterra), hecho que se asoció a la ingesta de cacahuets contaminados por aflatoxinas. Desde ese momento y hasta la actualidad existe

un creciente interés en el control de los niveles de estos contaminantes en alimentos. Si bien es cierto que las micotoxinas no pueden ser eliminadas completamente, sí que es posible restringir los niveles máximos en los alimentos de consumo humano y piensos para que así la exposición de la población a través de la cadena alimentaria no suponga un riesgo. De forma general, las micotoxinas pueden provocar una amplia variedad de efectos adversos en la salud en función de su naturaleza química: algunas afectan al sistema inmunitario, mientras que otras son teratogénicas, mutagénicas y/o carcinógenas en ciertas especies de animales. También han sido asociadas con algunas enfermedades crónicas y agudas en diferentes partes del mundo, tanto en animales como en humanos. En los años 1993 y 2002, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer de la OMS^{2,3} evaluó el potencial carcinogénico de las aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, fumonisinas y el grupo de tricotecenos. Las aflatoxinas fueron clasificadas como *Carcinogénicas* (Grupo 1), mientras que se concluyó que la ocratoxina A y las fumonisinas son *Posiblemente Carcinogénicas* (Grupo 2B). Sin embargo, los tricotecenos y la zearalenona no pudieron ser clasificados como carcinogénicas (Grupo 3). No obstante, en la actualidad aún no se conocen con precisión sus efectos sobre la salud humana ni tampoco los niveles de exposición habituales⁴.

En general, la exposición a micotoxinas es más habitual en países poco desarrollados, donde es común el uso de métodos poco exhaustivos para manipular y almacenar los alimentos. A su vez, este hecho suele ir ligado a problemas de malnutrición y a la baja o nula regulación de éstas. No obstante, también se ha descrito la presencia de micotoxinas a niveles bajos en distintos alimentos en países desarrollados. Por ejemplo, un reciente estudio de la dieta total en la Comunidad Valenciana de Beltran et al.⁵ mostró resultados positivos de la presencia de deoxinivalenol en cereales y de fumonisina B₁ tanto en cereales de desayuno como en cervezas. No obstante, los niveles obtenidos de micotoxinas no superó en ningún caso los contenidos máximos regulados en el reglamento 1881/2006/EC⁶ ni en ninguna de sus posteriores modificaciones.

Tabla 4.1 Contenidos máximos permitidos de micotoxinas reguladas en alimentos de consumo humano^a y en piensos^b.

Compuesto	Alimentos (µg/Kg)	Alimentos infantiles (µg/Kg)	Piensos ^b (µg/Kg)
Aflatoxina B ₁	2.0-8.0	0.1	5-20 ^d
Suma de aflatoxinas (B ₁ , B ₂ , G ₁ y G ₂)	4.0-15.0	-	-
Deoxinivalenol	500-1750	200	900-12000
Ocratoxina A	2-10	0.5	50-250
Zearalenona	50-200	20	100-3000
Suma de fumonisinas (B ₁ y B ₂)	400-2000	200	500-60000
Suma de toxinas (HT-2 y T-2) ^c	25-1000	15	250-2000

^a Reglamento de la Comisión Europea 1881/2006⁶

^b Recomendación de la Comisión Europea 2006/576/EC⁷

^c Directiva de la Comisión Europea 2013/165/EU⁸

^d Reglamento de la Comisión Europea 574/2011⁹

Como ya se ha comentado en la introducción, son múltiples las agencias que intentan regular las cantidades máximas permitidas de micotoxinas en alimentos para asegurar la salud de la población, incluyéndose la FAO, la WHO y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, *European Food Safety Authority*)¹⁰. A finales del 2003 unos 100 países disponían de legislación referente a los niveles de micotoxinas en la industria alimentaria (cubriendo aproximadamente el 85% de la población mundial), principalmente incluyendo a 13 micotoxinas¹⁰. En Europa, la legislación concerniente a los niveles máximos de micotoxinas en distintos alimentos para consumo humano y para piensos está establecida mediante diversos reglamentos y directivas de la Comisión Europea. En éstas se han establecido límites de unos pocos ng/g para un gran número de combinaciones de analito-matriz. Los intervalos legislados pueden consultarse en Tabla 4.1. Por su parte, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) es la encargada de establecer los niveles máximos regulados en EEUU¹¹. Comparando ambas directivas destaca que la europea es mucho más específica

en cuanto a combinaciones matriz-micotoxina. No obstante, tal y como bien señaló P. van Egmond¹⁰, la regulación no es un proceso tan simple ya que depende en gran medida de los hábitos alimenticios de la población y del número de fuentes a las que están expuestas.

Metodologías de análisis

La presencia de micotoxinas en alimentos y su determinación analítica se ha convertido en un constante desafío. El proceso de generar nueva legislación referente a estos metabolitos va intrínsecamente ligado al desarrollo de nuevas metodologías de análisis, cada vez más fiables (robustas, exactas y precisas), y a su validación mediante la realización de ejercicios de intercomparación¹². Como ya se ha comentado anteriormente, la diversidad de estructuras químicas de las micotoxinas unidas a la necesidad de alcanzar límites de cuantificación del orden de los ng/g, continua siendo un reto analítico. Por este motivo, desde su reconocimiento como problema en los años 60, se han utilizado un gran número de métodos de análisis para la detección y cuantificación de micotoxinas. Entre ellos se incluyen a los análisis por HPLC con detectores ultravioleta (UV) y fluorimétricos, los cuales continúan empleándose tanto para investigación como para controles rutinarios. Otras técnicas, tales como la cromatografía en capa fina (TLC) o la GC también son utilizadas en función del laboratorio. Por otra parte, el hecho de que normalmente los métodos cromatográficos impliquen tiempos de tratamiento de muestra y análisis bastante largos ha dado paso al desarrollo de métodos más rápidos basados en técnicas inmunológicas. Entre otros, ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), fluorimetría directa, polarización por fluorescencia y diversos métodos que emplean biosensores¹². Todos ellos se caracterizan por su bajo coste y fácil manipulación, ofreciendo en unos pocos minutos resultados cuantitativos y semicuantitativos de las micotoxinas de interés¹³.

Por otro lado, los avances en LC-MS, señalados en capítulos anteriores, han hecho que ésta técnica se haya impuesto sobre el resto, especialmente en el campo del análisis multiresidual, puesto que permite cuantificar un gran número de analitos en una sola inyección.

En concreto, el acoplamiento LC-MS/MS se utiliza muy ampliamente en métodos de barrido (*screening*), de identificación y de cuantificación para un elevado número de micotoxinas. Mediante esta tecnología es posible alcanzar los niveles de sensibilidad y confirmación requeridos por la legislación. Todo ello con un coste por analito bastante bajo. Además, estas características enlazan perfectamente con la clara tendencia actual de desarrollar métodos multianalito en general¹⁴ y para micotoxinas en particular¹⁵. La búsqueda de métodos rápidos y sencillos se centra también en la reducción de la etapa de tratamiento de muestra. En muchos casos, esta etapa incluye una única extracción seguida de la dilución del extracto y su posterior determinación instrumental (“dilute and shoot methods”). No obstante, la bondad del análisis por LC-MS/MS se ve mermada por la exaltación del efecto matriz en los extractos no sometidos a procesos de purificación. El estudio de este efecto matriz y su resolución se aborda con bastante profundidad en este mismo capítulo.

En el siguiente estudio, incluido en el artículo científico 5, se han comparado las principales metodologías de cálculo que permiten corregir el efecto matriz en el análisis de micotoxinas por LC-ESI-MS/MS en matrices de alta complejidad. Para ello, se han estudiado 9 micotoxinas (Figura 4.1): aflatoxina B₁ (AFB₁), fumonisinas B₁, B₂ y B₃ (FB₁, FB₂ y FB₃) ochratoxina A (OTA), deoxinivalenol (DON), las toxinas T-2 y HT-2 así como zearalenona (ZEA). Esta selección se basó en primer lugar en la disponibilidad de sus análogos enriquecidos con ¹³C para cada una de ellas y a su inclusión en la normativa vigente europea. Por otra parte, dada la disponibilidad de la ¹³C-FB₃, se decidió incluirla en la comparativa ya que también suele estar presente en cereales contaminados, aunque no se encuentra regulada. En cuanto a la no inclusión de

la aflatoxina M₁ y la patulina esto se debe a que sus características fisicoquímicas hacen difícil su análisis en métodos multiresiduo. Además, la aflatoxina M₁ sólo se observa en derivados de la leche y la patulina en derivados de las manzanas, matrices que no han sido el objeto de este estudio.

4.2 Comparación de distintas estrategias para contrarrestar el efecto matriz en el análisis de micotoxinas en alimentos de consumo humano y piensos

Como ya se ha comentado de manera reiterada en la introducción general y en apartados anteriores, el efecto matriz (ME) es probablemente el mayor problema con el que se enfrenta el acoplamiento LC-MS. En el capítulo 1 se han enumerado las causas del efecto matriz y las diferentes estrategias para su eliminación o atenuación. Puesto que en este apartado se aborda el estudio de dicho efecto, se realizará una descripción más detallada de los procesos que pueden provocar disminución de la señal durante la ionización en la fuente ESI así como de las estrategias para evaluar su presencia y para minimizarlo. Cabe comentar en primer lugar que la variación de la eficiencia de ionización en compuestos que coeluyen con los analitos se ha observado tanto en las fuentes de ESI como de APCI (ionización química a presión atmosférica), aunque la primera, la que se ha utilizado en esta tesis, es mucho más susceptible a ello¹⁶.

El proceso de supresión de la señal en la fuente ESI puede ser debido a diferentes mecanismos, tanto en fase gas como en fase líquida. El mecanismo en fase gas está relacionado con la formación de compuestos neutros o con reacciones de transferencia de carga que neutralicen la del analito. En fase líquida se han descrito un mayor número de mecanismos (Figura 4.2). Entre ellos, la competición por el espacio y por el exceso de carga en la superficie de las microgotas del aerosol entre el analito y los compuestos que coeluyen con él, que pueden formar parte de la muestra o ser introducidos durante el tratamiento de muestra y la separación cromatográfica. Por otro lado, la modificación de la viscosidad y de la tensión superficial dificultan tanto los procesos de evaporación del disolvente como la llegada de los analitos a la superficie de la gota y su posterior evaporación. Todos estos mecanismos pueden darse por separado o conjuntamente y provocan una disminución de la

señal que no sufre el patrón de referencia si está preparado en disolvente. La supresión de la señal conlleva, además, una pérdida de sensibilidad del instrumento, de manera que no es posible alcanzar los LOQ deseables o se pierde por completo la señal de la transición de confirmación incluso en equipos altamente sensibles. En todos los casos la clave para solucionar el problema implica llevar a cabo la calibración en idénticas condiciones a la medida de la muestra.

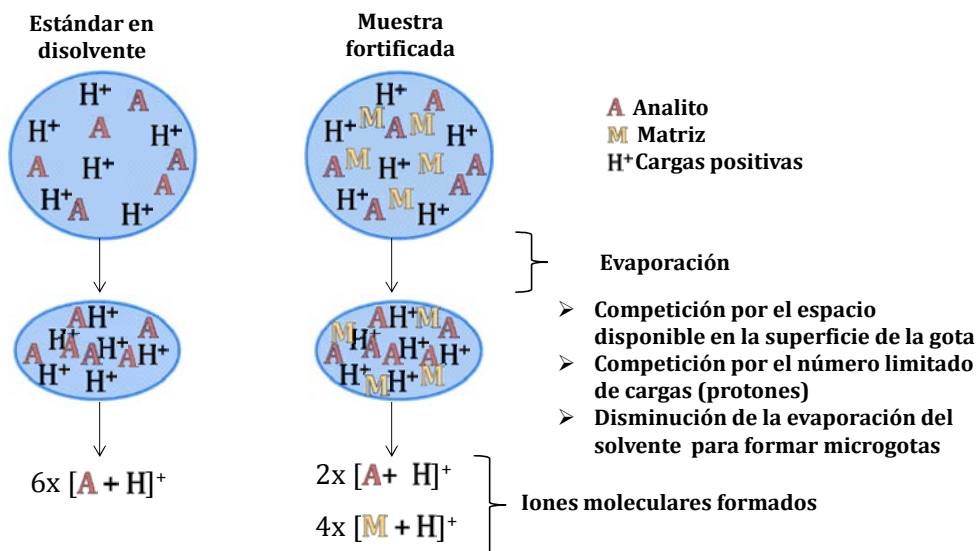


Figura 4.2 Principales causas del efecto matriz en ESI.

Ante la problemática del efecto matriz, el primer paso es evaluar su presencia y extensión. Para ello ya en el año 1996 se propusieron dos formas de estudiarlo: la fortificación de los extractos tras la extracción y la infusión post-columna¹⁷.

La forma más sencilla de evaluar el ME es mediante la comparación de la señal de un analito en una muestra fortificada tras la extracción (B) con la respuesta de un disolución patrón de la misma concentración preparada en disolvente (A). (Figura 4.3a). En esta técnica, si la señal del extracto es menor que la del patrón habrá supresión de señal mientras que a la inversa la matriz produciría exaltación de la señal. Esta forma de evaluar ME, también conocida como

recuperación aparente, se suele expresar como la relación entre señales $(B)/(A)$ en porcentaje.

En cuanto a la infusión post-columna (Figura 4.3b), esta consiste en la introducción continua de un compuesto de referencia, normalmente a través de una pieza en forma de "T", que se encuentra entre la columna cromatográfica y la fuente de ionización. La infusión post-columna ha sido típicamente una forma cualitativa de evaluar el efecto matriz, aunque recientes estudios la proponen también como un método cuantitativo siempre y cuando el compuesto de referencia monitorizado sea representativo de todos los analitos estudiados¹⁸. En esta aproximación, el efecto sufrido por el compuesto monitorizado se extrapola al resto de analitos suponiendo que el ME depende, exclusivamente, de su tiempo de retención.

La tercera técnica conocida para evaluar de forma cuantitativa el efecto matriz consiste en una versión más compleja de la primera aproximación. Para ello, es necesario comparar la señal de un analito añadido a una muestra antes de la extracción (C), la del mismo analito añadido tras la extracción de la muestra(B) y la de un patrón preparado en disolvente(A); todas a un mismo nivel de concentración. Con estos datos, se obtendría el efecto matriz como B/A , la eficiencia del proceso de extracción como C/B y la eficiencia global del proceso como C/A , teniendo en cuenta tanto la recuperación obtenida así como el efecto matriz. Otra variante de este tipo de cálculos implica hacer la división entre las correspondientes pendientes de las curvas de calibrado¹⁹.

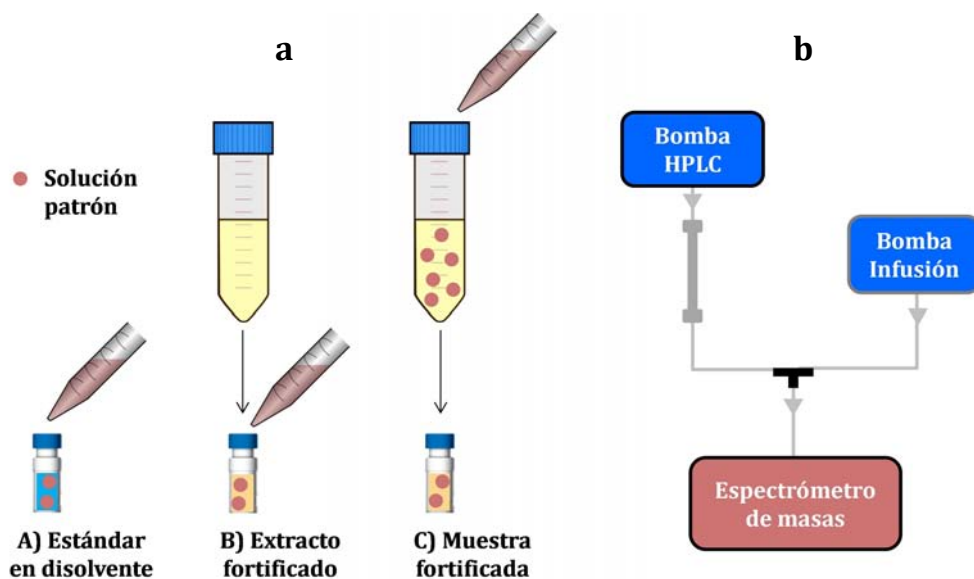


Figura 4.3 Evaluación del ME por a) adición tras la extracción y b) infusión post-columna.

Durante el desarrollo y validación de nuevos métodos de análisis no sólo es aconsejable conocer el alcance del efecto matriz, sino que resulta imprescindible minimizarlo al máximo. La forma más sencilla de reducirlo es mediante dilución del extracto, para así reducir la presencia de interferencias en el extracto final. Sin embargo la dilución también supone una disminución de la concentración de analito en el extracto y, aunque la disminución de la matriz suele producir un aumento de la señal, se debe alcanzar una situación en la que la ésta no esté comprometida.

La segunda forma de hacer frente al efecto matriz implica un desarrollo experimental más exhaustivo que conduzca a una mayor eliminación de la matriz. Así, la aplicación de una extracción más selectiva de los analitos de interés en detrimento del resto de componentes de la matriz o la realización de una purificación extra del extracto final (*clean-up*) son medidas que favorecen

la disminución de interferentes. Por otra parte, la mejora en la separación cromatográfica de los analitos respecto de los interferentes del extracto también ayuda a este propósito. Sin embargo, estos procesos aumentan de forma considerable tanto el tiempo de desarrollo de la metodología como el tiempo del tratamiento de muestra.

Por otro lado, es conocido que el cambio de la fuente de ionización habitual, normalmente de ESI, por otra menos susceptible a sufrir ME como APCI, puede ser de gran ayuda ante este problema siempre que los analitos de interés se ionicen adecuadamente.

En el caso de que el ME no haya podido ser eliminado eficientemente mediante ninguna de las aproximaciones anteriores, o no se dispone de tiempo suficiente para desarrollar de forma exhaustiva una metodología analítica, la tercera opción es compensarlo aplicando calibrados metodológicos. Ésta es una aproximación especialmente importante en métodos multianalito, para los que resulta imposible o poco práctico eliminar la matriz sin perder alguno de los compuestos de interés. Las metodologías de calibrado más utilizadas son las siguientes:

Adiciones estándar. Es la forma clásica de corregir el efecto matriz ya que la misma muestra es fortificada con el analito o analitos de interés a distintos niveles de concentración (normalmente entre 1.5 y 3 veces la concentración endógena del compuesto en la muestra). Compensa de forma adecuada el efecto matriz, pero requiere de la preparación y medida de múltiples muestras fortificadas así como de fortificar a un nivel adecuado a la concentración inicial, no conocido a priori. No obstante, resulta muy útil cuando no se dispone de patrones internos tal y como se verá más adelante.

Calibrado en matriz. Consiste en la preparación de curvas de calibrado en extractos de la matriz a analizar. Esta aproximación es de fácil aplicación siempre y cuando se disponga de matrices blanco de cada muestra. Sin

embargo, normalmente resulta bastante complicado encontrar este tipo de extractos, especialmente para matrices compuestas.

Uso de patrones internos. Este tipo de corrección utilizando análogos enriquecidos isotópicamente (ILIS) es la metodología más extendida en la actualidad, ya que la ionización entre ambos es teóricamente la misma¹⁷. Cabe comentar que la utilización de homólogos estructurales no siempre resulta efectiva pues el comportamiento no es idéntico en todas las condiciones experimentales. Por lo que respecta a ILIS, los más adecuados son los marcados con ^{13}C (o ^{15}N) pues estos elementos forman parte del esqueleto molecular (enlaces tipo C-C, C-N) y sus compuestos son más estables comparados con los marcados con ^2H . En este caso, el enlace C-H es más lábil y, por otro lado, la interacción del H con el medio es diferente a la que experimenta el ^2H . El procedimiento conlleva la realización de una curva de calibrado mediante la señal del analito de interés y su correspondiente patrón interno, para así obtener una señal relativa de éste frente a la concentración. Las desventajas ya han sido descritas en la introducción, pero de forma general destacan la falta de compuestos marcados isotópicamente y el elevado precio de éstos.

Desarrollo experimental

En el caso de la cuantificación de micotoxinas por LC-ESI-MS/MS, compensar el efecto matriz resulta fundamental ya que su determinación es llevada a cabo normalmente en matrices complicadas. Por ello, en la quinta contribución científica incluida en esta tesis se estudió la magnitud del efecto matriz y su corrección en dos especias (nuez moscada y cúrcuma) y en tres alimentos de consumo animal (maíz, paja y pienso). Un ejemplo de cromatograma de la separación realizada se puede consultar en la Figura 4.4.

Para ello se llevó a cabo una extracción genérica sólido-líquido desarrollada en el RIKILT (Wageningen, Países Bajos) para la determinación de micotoxinas en alimentos. El método implica la extracción de 2.5 g de muestra empleando 10 mL de extractante formado por una mezcla de acetonitrilo y agua acidificada con ácido fórmico (86:16:1). Pasadas dos horas, los extractos se centrifugaron y se diluyeron 1:1 con agua Milli-Q, para finalmente ser filtrados con unos viales especiales que contenían el filtro.

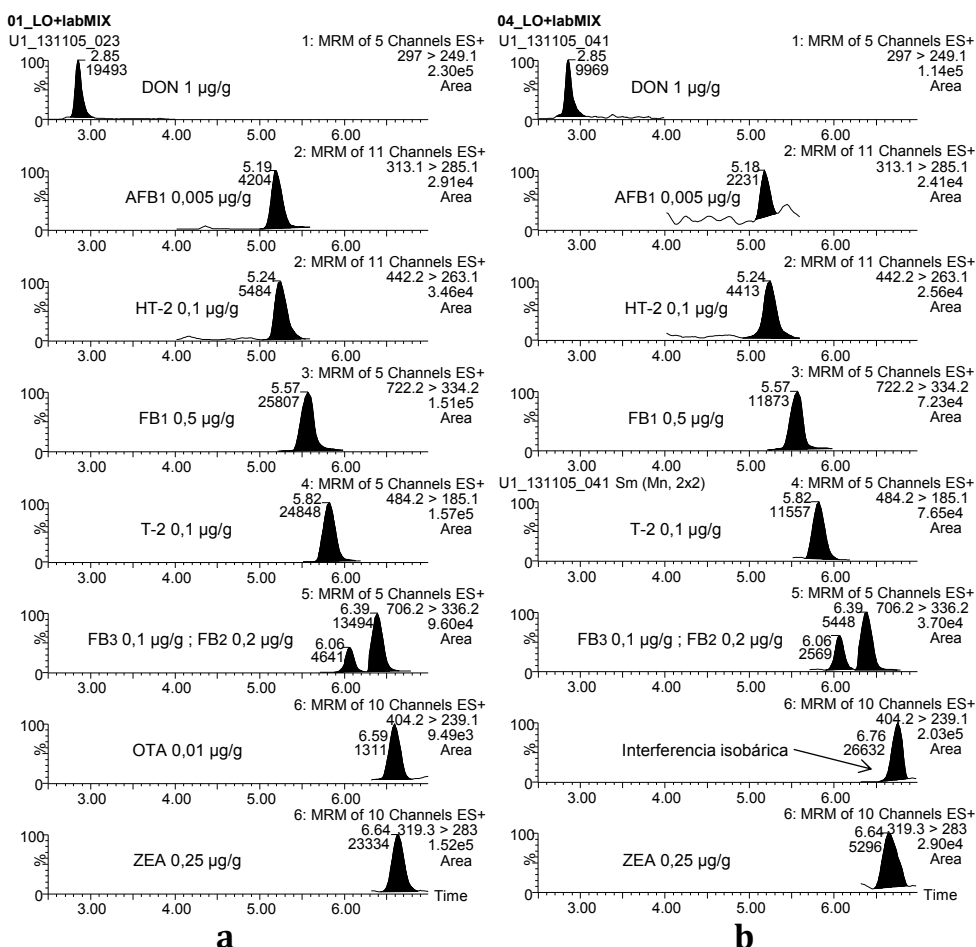


Figura 4.4 Cromatogramas UHPLC-MS/MS para las nueve micotoxinas en a) maíz y b) nuez moscada. El nivel de fortificación se indica en los cromatogramas.

En una primera aproximación, se estudió la compensación del efecto matriz mediante la monitorización de un compuesto infundido de forma constante a través de la fase móvil, de acuerdo con las conclusiones obtenidas en el trabajo de Stanhke et al.¹⁸. Según este estudio, era posible corregir el efecto matriz al que se encontraba expuesto un compuesto a un determinado tiempo de retención aplicando el efecto matriz del compuesto monitorizado. En el presente trabajo, para estudiar esta aproximación se monitorizaron tres compuestos como marcadores de matriz: carbendazima, clomequat y ¹³C-caféina; y se usaron seis matrices con efecto matriz de moderado a alto: subproductos de soja, paja, nuez moscada, pimentón, cúrcuma y jengibre.

Todas las combinaciones de compuestos monitorizados-matrices fueron estudiadas para comprobar si esta aproximación era aplicable en la compensación del efecto matriz en las nueve micotoxinas seleccionadas. No obstante los resultados no fueron satisfactorios, por lo que se rechazó esta aproximación.

En una segunda parte del trabajo se estudió la corrección del efecto matriz mediante la aplicación de diferentes calibrados metodológicos. Por una parte, se utilizaron las adiciones estándar a tres niveles, lo que permitió tanto el cálculo utilizando la curva de calibrado completa como utilizando un sólo nivel de fortificación. Por otra, se adicionó a los extractos tras la extracción los ILIS enriquecidos con ¹³C para cada una de las micotoxinas (U-labeled: todos los ¹²C en la molécula sustituidos por ¹³C). Esto permitió realizar dos métodos de cálculo sin la necesidad de curva de calibrado, IPD y OPIC (calibrado interno utilizando un punto), además de la realización de curvas de calibrado utilizando los ILIS a modo de patrón interno. Cabe comentar que la adición antes de la extracción (a modo de "surrogate") se descartó dado el elevado precio de los ILIS. Sin embargo, mediante adiciones estándar se comprobó que la extracción era cuantitativa y los resultados fueron correctos. La descripción completa de estas metodologías se puede consultar más adelante en el artículo incluido en este capítulo.

De forma general tal y como se puede consultar en la Figura 4.5, el deoxinivalenol y la aflatoxina B₁ son los compuestos más afectados por el efecto matriz, obtenido mediante la fortificación post-extracción. También destaca la marcada supresión en ambas especies, sobre todo en el caso de la cúrcuma que llega incluso superar el 90%.

En cuanto a las recuperaciones obtenidas mediante las distintas metodologías de cálculo realizadas, se puede concluir que el uso de ILIS como patrón interno mediante curvas de calibrado resultó ser la metodología más adecuada. Sin embargo, se comprobó que en caso de no disponer de estos ILIS, la aplicación de adiciones estándar a un solo nivel es la forma óptima de cuantificación.

Por otra parte las cuantificaciones mediante ILIS que evitan el uso de curva de calibrado (IPD y OPIC) aportaron resultados de recuperaciones satisfactorios, exceptuando los valores excesivamente altos para las fumonisinas. Esta problemática debería de ser estudiada más adelante, a ser posible con marcados que contuvieran un solo ¹³C. Para estas dos metodologías de cálculo, fue posible evitar el uso de curvas de calibrado, reduciendo así el tiempo total de análisis.

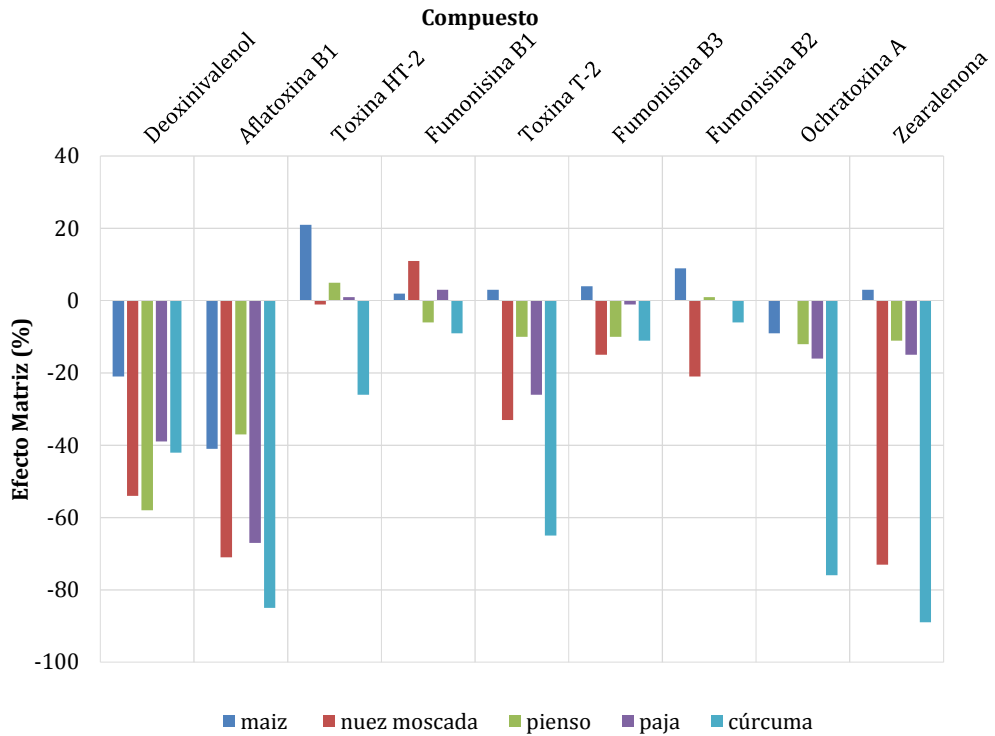


Figura 4.5 Efecto matriz observado para las nueve micotoxinas en las cinco matrices estudiadas.

4.2.1 Artículo científico 5

Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed

Accepted in *World Mycotoxin Journal*

Fabregat-Cabello, N., Zomer, P., Sancho, J.V., Roig-Navarro, A.F. & Mol, H. G. J.

World Mycotoxin Journal



Wageningen Academic
Publishers



Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed

Journal:	World Mycotoxin Journal
Manuscript ID:	wmj-2014-12-1872.R1
Manuscript Type:	Research article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Fabregat-Cabello, Neus; Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, Zomer, Paul; RIKILT, Natural Toxins and Pesticides Sancho, Juan V.; Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, Roig-Navarro, Antoni Francesc; Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, Mol, Hans; RIKILT, Natural Toxins and Pesticides
Keywords:	matrix effects, calibration, dilution mass spectrometry, ion suppression, standard addition

SCHOLARONE[™]
Manuscripts

Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed

(Accepted with major revision in World Mycotoxin Journal)

N. Fabregat-Cabello,^a P. Zomer,^b J. V. Sancho,^a A. F. Roig-Navarro,^a H. G. J. Mol.^{*,b}

^a*Research Institute for Pesticides and Water, Universitat Jaume I, E-12071, Castellón, Spain.*

^b*RIKILT, Wageningen University and Research Centre, Akkermaalsbos 2,6708 WB Wageningen, The Netherlands; hans.mol@wur.nl*

ABSTRACT

This study deals with one of the major concerns in mycotoxin determinations: the matrix effect related to LC-MS/MS systems with electrospray ionization (ESI) sources. To this end, in a first approach, the matrix effect has been evaluated in two ways: monitoring the signal of a compound (added to the mobile phase) during the entire chromatographic run, and by classical post-extraction addition. The study was focused on nine selected mycotoxins: aflatoxin B₁, fumonisins B₁, B₂ and B₃, ochratoxin A, deoxynivalenol, T-2 and HT-2 toxins and zearalenone in various sample extracts giving moderate to strong matrix effects (maize, compound feed, straw, spices). Although the permanent monitoring of a compound provided a qualitative way of evaluating the matrix effects at each retention time, we concluded that it was not adequate as a quantitative approach to correct for the matrix effect. Matrix effects measured by post-extraction addition showed that the strongest ion suppression occurred for the spices (up to -89%). Five different calibration approaches to compensate for matrix effects were compared: multi-level external calibration using isotopically labelled internal standards, multi-level and single level standard addition, and two ways of single-point internal

calibration: one point isotopic internal calibration (OPIC) and isotope pattern deconvolution (IPD). In general, recoveries and precision meeting the EU requirements could be achieved with all approaches, with the exception of the single level standard addition at levels too close to the concentration in the sample. When an isotopically labelled internal standard is not available, single-level standard addition is the most efficient option.

KEYWORDS: matrix effects, calibration, isotope dilution mass spectrometry, ion suppression, standard addition

1. INTRODUCTION

Mycotoxins are low-molecular-weight products of the secondary metabolism of some fungi, mainly from the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, which are produced after a period of active growth or response to stress conditions [1]. These fungi grow mainly in cereals, but can also be found in fruits, spices, nuts or fodder. The interest of controlling the presence of the mycotoxins in food and animal feeds lies in the health problems they can induce due to their toxicity, including hepatic, gastrointestinal and carcinogenic diseases [2]. For this reason maximum levels for food and feed have been established by the European Union [3–6].

In order to be able to determine the mycotoxins at the levels required by legislation a wide range of analytical methods are developed each year [7,8]. For screening and semi-quantitative analysis, various immunochemical assays have been developed, including radio-immunoassays, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and sandwich ELISA, chemiluminiscent and fluorescent immunoassays, and lateral flow and flow-through immunoassays. For confirmatory and quantitative analysis, methods based on gas chromatography (GC) or high-performance liquid chromatography (HPLC) are commonly employed. In GC analysis, typically involving derivatization, the

mycotoxins are detected by electron capture detection (ECD), flame ionization (FID) or mass spectrometry (MS). In HPLC the most common detectors are ultraviolet (UV), diode array (DAD), fluorescence (FD) and MS [9]. A clear trend can be seen to develop multi-mycotoxin methods based on liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the simultaneous identification and quantification of the sought compounds [8,10].

LC-MS/MS is one of the most powerful tools for organic compound analysis due to its high selectivity, sensitivity, and throughput. However, its quantitative performance can be affected by the matrix effect, especially when an electrospray ionization source (ESI) is used.

The matrix effect is the alteration of the ionization efficiency of a compound, due to the presence of substances co-eluting with the target analyte [11]. Matrix effects can depend on source design and therefore differ from instrument to instrument. It can cause either an enhancement or suppression of the compound signal but the latter is more common [12]. Consequently, it is necessary to test and study the matrix effect during the development and validation of each new method. The evaluation of the matrix effect can be performed mainly by two approaches: by post-extraction addition or by post-column infusion [13]. The post-extraction addition is based on the comparison between the peak area of a standard prepared in solvent and the area obtained after spiking an extract of a blank sample at the same concentration. In the case of post-column infusion the target compound is added to the eluent through a T-piece after the LC column. The signal of the target compound is monitored after injection of a blank sample extract. Response fluctuations of the target compound reflect the matrix effect.

A wide variety of strategies can be employed in order to overcome the matrix effect [12,13]. The simplest possibility is a dilution of the sample extract in solvent, but since it diminishes the amount of analyte introduced in the system, this is only a viable option when the required LOQ can still be achieved [14]. In

the same line, a low injection volume combined with a high flow rate can also decrease the matrix effect. Other options are a more exhaustive method development by the optimization of chromatographic separation (avoiding compounds to co-elute with the target analytes), improving sample clean-up and selective extraction. Measuring the analytes as negative ion can also reduce matrix effects. The main drawbacks of these approaches are that the total time for method development is considerably increased and that the method becomes less suitable for simultaneous determination of multiple mycotoxins with different physical-chemical properties.

An alternative to the elimination of the matrix effect is compensating for it by using certain calibration approaches. These include matrix-matched calibration, the standard addition method, or the use of internal standards. Matrix-matched calibration requires the availability of non-contaminated material of the same composition as the sample and assumes that the matrix effect for a certain product is the same for different samples from that product which is not necessarily true [15]. In case different matrices are to be analysed, separate matrix-matched calibration standards need to be prepared for each matrix. This is also the case for standard addition approaches, but here the advantage is that no *a priori* knowledge of the sample composition is required which facilitates the analyses of composite products (e.g. multi-ingredient food products, compound feed).

Matrix-matched calibration using one individual model-sample is inferior to standard addition or the internal standardization, as the compensation is physically performed in each sample. In case of internal standardization, as the use of a homologue cannot always compensate such variability, isotope labeled internal standard (ILIS) seems a better option. Among the available labelled internal standards, ¹³C-labelled are preferred over deuterated analogues in order to guarantee the perfect co-elution with their natural analogue. The use of ILIS is recognised as the most efficient way to compensate for matrix effects; however, availability and cost may limit the applicability in routine practise

[16]. Nevertheless, it has been shown that the additional cost can be as low as 2 EUR per sample when the labels are added to a small volume of the final extract [17]. A common approach is to add the label to the sample (or extract), and to the solvent-calibration standards. The responses are normalized to that of the label and all samples can be quantified based on one solvent-based calibration curve. An alternative and even more straightforward way of using the isotope labels is one-point isotopic internal calibration (OPIC) often used as a compromise between the necessary calibration and workload [18]. Here the label is added to the sample (or extract) as well but no external calibration standards are used, i.e. the concentration in the sample is calculated based on the response of the label in that same sample and only one injection is required for both analysis of the sample and calibration. The isotope pattern deconvolution (IPD) method also makes use of this way of calibration but using a different quantification procedure. This alternative approach is based on the determination of the molar fractions for each pure isotope pattern (natural abundance or labeled) contributing to the isotope pattern observed in the mixture (spiked sample) by multiple linear regression in which a least square fitting can be applied. A simple equation is employed for the determination of the concentration of the analyte as the ratio of molar fractions is equal to the ratio of molar concentrations in the mixture [19,20].

An interesting and completely different approach that would eliminate the need for matrix-matching, standard addition, and isotope labels, is the use of the signal suppression (or enhancement) measured for one specific 'matrix-marker' substance monitored throughout the chromatographic run, to compensate for the matrix effect. This idea from Stahnke [21] relies on their observation that different compounds experience the same matrix effect at the same retention time.

This article reports on a comparative study of different strategies to account for matrix effects in LC-ESI-MS/MS. First the applicability of the approach proposed by Stahnke et al. to mycotoxins in highly complex matrices was

investigated. Subsequently, we compared the following calibration approaches to compensate for matrix effects with respect to accuracy and efficiency: multi-level external calibration using isotopically labelled internal standards, the standard addition method (multi-level and single level), and two single-injection methods (OPIC and IPD). This was done for nine mycotoxins in five matrices of increasing complexity.

As far as we know, the comparison of different methodologies of matrix effect compensation in mycotoxin determination has only been recently evaluated in OTA in grapes, musts and wines by stable isotope dilution assay and diastereomeric dilution assay methods [22].

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents and materials

HPLC grade solvents methanol and acetonitrile were purchased from Biosolve (Valkenswaard, The Netherlands). Ultra-pure water was obtained from a Milli-Q system (Millipore Co., Bedford, USA). Formic acid (>98% purity), ammonium formate (>99%), ammonium acetate (>99%) and ¹³C₃-caffeine (>99%) were obtained from Sigma–Aldrich (Zwijndrecht, The Netherlands) and carbendazim and chlormequat from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

Biopure® mycotoxin standard solutions of unlabelled HT-2 and T-2 toxins in acetonitrile, uniformly [¹³C]-labelled (U-labelled) compounds aflatoxin B₁ (AFB₁), deoxynivalenol (DON), T-2 and HT-2 toxins, ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEA) in acetonitrile and fumonisins B₁, B₂ and B₃ (FB₁, FB₂ and FB₃) in acetonitrile/water were purchased from Romer Labs Diagnostic GmbH (Tulln, Austria). FB₃ standard solution in acetonitrile/water was acquired from PROMEC Unit (Medical Research Council, Tygerberg, South Africa). The other unlabelled mycotoxins standards were supplied by Sigma–Aldrich: FB₁, FB₂, DON, OTA and ZEA as a pure solid (purity higher than 98%) and AFB₁ in an acetonitrile solution. Individual stock solutions of fumonisins were prepared in

acetonitrile/water (1:1), DON, T-2 and HT-2 toxins, OTA and ZEA solutions were prepared in acetonitrile.

The stocks of the unlabelled and the U-labelled compounds were combined into two working solutions (one for the unlabelled mycotoxins in acetonitrile/water (80:20, v/v) and one for the U-labelled analogues in acetonitrile). The working solution of the unlabelled mycotoxins had the following concentrations: AFB₁, 20 ng/mL; DON, 4000 ng/mL; FB₁, 2000 ng/mL; FB₂, 800 ng/mL; FB₃, 400 ng/mL; HT-2, 400 ng/mL; OTA, 40 ng/mL; T-2, 400 ng/mL; ZEA, 1000 ng/mL. For the internal calibration method the exact concentration of the labels need to be known. Therefore the concentrations of the [¹³C]-labelled working solutions obtained were determined by reverse isotope dilution analysis and established to be: [¹³C₁₇]-AFB₁, 10.78 ng/mL; [¹³C₁₅]-DON, 1290 ng/mL; [¹³C₃₄]-FB₁, 462 ng/mL; [¹³C₃₄]-FB₂, 270 ng/mL; [¹³C₃₄]-FB₃, 130 ng/mL; [¹³C₂₂]-HT-2, 250 ng/mL; [¹³C₂₀]-OTA, 28 ng/mL; [¹³C₂₄]-T-2, 224 ng/mL and [¹³C₁₈]-ZEA, 700 ng/mL. All standard solutions (stock, intermediate and working solutions) were stored in amber glass bottles in a fridge. Prior to usage, the working solutions were brought to room temperature and were mixed thoroughly.

2.2 Samples

Feed samples (soybean meal and wheat straw) and spice samples (nutmeg, paprika, curcuma and ginger) were used to study the feasibility of the compensation of matrix effects through of a 'matrix-marker' substance. The comparison of different calibration strategies was carried out using five different food and feed commodities: maize, compound feed, wheat straw, nutmeg and curcuma. The selection of the matrices was based on the moderate to strong signal suppression associated with these types of matrices. Maize was chosen as the least complex matrix in this work, but its relative high matrix effects have been widely described [23,24].

2.3 Sample preparation

Ground and homogenized samples (2.50 ± 0.01 g) were weighed into 50-mL polypropylene tubes. Samples were extracted by shaking with 10 mL acetonitrile/water/formic acid (84:16:1) (extraction solution) on a mechanical shaker (SM 30 control, Edmund Bühler, Hechingen, Germany) (170-200 mov/min) for 2 hours. Afterwards the tubes were centrifuged at 3000 rpm for 5 min. and 200 μ L of supernatant was two-fold diluted with HPLC-grade water directly in a filter vial (Mini-UniPrep, 0.45 μ m, Whatman, Forham Park, NJ, USA). In case internal standards were added, this was done at this stage (for details see below). The vials were closed with the corresponding filters and mixed by vortex for 3 s. After being stored in the fridge for 30 min. in order to precipitate part of the co-extracted matrix, the extracts were filtered by pressing down the filters.

Due to the high absorption capability of straw samples, the volume of extraction liquid was increased to 20 mL for these samples. Besides, the high degree of homogeneity of spice samples permitted to reduce the amount of sample to (0.50 ± 0.01 g) and consequently the volume of extraction solution to 2 mL. These samples were extracted in 15-mL Falcon tubes and extracted as described above.

2.4 LC-MS/MS analysis

An UPLC™ system (Acquity, Waters, Milford, MA, USA) coupled to a Micromass Quattro Ultima triple quadrupole mass spectrometer was used (Waters). The analytical column was an Ultra aqueous C18 (3 μ m particle size, 2.1 mm x 100 mm; Restek, Bellefonte, PA, USA), at a flow rate of 0.4 mL/min. The column temperature was set at 35°C and the injection volume was 5 μ L. The mobile phase was a time programmed gradient using A (H₂O) and B (MeOH/H₂O (95:5)). For positive electrospray conditions both mobile phases were modified with ammonium formate (1mM) and formic acid (1% v/v). Zearalenone in curcuma samples was analysed separately in a second run by

negative ionization using mobile phases modified with ammonium acetate (5mM) and acetic acid (0.1%). The percentage of organic modifier (B) was changed linearly as follows in both conditions: 0 min, 0%; 1 min, 0%; 2min, 50%; 3 min 50%; 8 min, 100%; 10 min, 100%; 10.5 min, 0 %; 15 min, 0%.

The mass spectrometer was operated with electrospray ionization in selected reaction monitoring (SRM) mode (Table 1). Transitions monitored for $^{13}\text{C}_3$ -caffeine, carbendazim and chlormequat were 198 > 140, 192.2 > 160 and 122.2 > 58.3 respectively. Capillary voltages of 2.5 kV (positive ionization mode) and 3.5kV (negative ionization mode) were applied. Nitrogen was used as the nebulizer gas and argon as the collision gas. The desolvation gas temperature was set to 350°C and the source temperature to 120 °C. The cone gas and desolvation flow were set at 200 and 550 L/h respectively. Dwell times of 80 ms/transition were used. Instrument control, data acquisition and evaluation (integration and quantification) were done with MassLynx software (v. 4.1, Waters).

2.5 Continuous measurement of a 'matrix-marker' substance to correct for matrix effects

The set up used was based on that described by Stahnke [21] However, instead of permanent post-column infusion of the matrix-marker substance into the eluent through a T-piece, which requires an additional pump, the monitored substance was introduced by adding it to the mobile phases.

Three different compounds ($^{13}\text{C}_3$ -caffeine, carbendazim and chlormequat) were selected as candidate matrix-marker substances and added at a level of 2.5 ng/mL to both organic and aqueous mobile phases. This level was in accordance with the post-column infusion conditions described by Stahnke et al. Carbendazim was evaluated as candidate to correct for matrix effects because of its successful use in the Stahnke work. Labelled caffeine was selected as an alternative and has the advantage that it will not be present in samples. Chlormequat, a cationic compound, was also employed since it

presented no interaction with the C18 column and eluted completely unretained.

Experiments were performed under positive electrospray conditions presented in Table 1. Sample extracts (200 µL) were spiked with 12.5 µL of the unlabelled mix solution and adjusted to a final volume of 400 µL with water. Standards were prepared in extraction solution/water (1:1) and injected after every 5 samples.

Table 1. Experimental conditions of the LC-(ESI)-MS/MS for the selected mycotoxins

Compound	Ret. time (min)	Precursor ion	Cone voltage (V)	SRM transitions ¹ Native compound	SRM transitions Isotopic label	SRM transitions IPD
Deoxynivalenol (DON)	2.8	[M+H] ⁺	20	297.0 > 249.1 (10) 297.0 > 231.1 (10)	312.0 > 263.1 (10)	297.0 > 249.1 (10) 298.0 > 250.1 (10) 312.0 > 263.1 (10)
Aflatoxin B1 (AFB ₁)	5.2	[M+H] ⁺	30	313.1 > 285.1 (20) 313.1 > 269.1 (30)	330.1 > 301.1 (20)	313.1 > 285.1 (20) 330.1 > 301.1 (20) 330.1 > 300.1 (20)
HT-2 Toxin (HT-2)	5.2	[M+NH ₄] ⁺	20	442.2 > 263.1 (10) 442.2 > 215.1 (15)	464.2 > 278.1 (10)	442.2 > 263.1 (10) 443.2 > 264.1 (10) 464.2 > 278.1 (10)
Fumonisin B1 (FB ₁)	5.5	[M+H] ⁺	30	722.2 > 334.2 (40) 722.2 > 352.2 (30)	756.2 > 356.2 (40)	722.2 > 334.2 (40) 723.2 > 335.2 (40) 756.2 > 356.2 (40)
T-2 Toxin (T-2)	5.8	[M+NH ₄] ⁺	20	484.2 > 185.1 (20) 484.2 > 305.1 (10)	508.2 > 198.1 (20)	484.2 > 185.1 (20) 485.2 > 186.1 (20) 508.2 > 198.1 (20)
Fumonisin B3 (FB ₃)	5.9	[M+H] ⁺	30	706.2 > 336.2 (40) 706.2 > 318.2 (40)	740.2 > 358.2 (40)	706.2 > 336.2 (40) 707.2 > 337.2 (40) 740.2 > 358.2 (40)
Fumonisin B2 (FB ₂)	6.1	[M+H] ⁺	30	706.2 > 336.2 (40) 706.2 > 318.2 (40)	740.2 > 358.2 (40)	706.2 > 336.2 (40) 707.2 > 337.2 (40) 740.2 > 358.2 (40)
Ochratoxin A (OTA)	6.6	[M+H] ⁺	30	404.2 > 239.1 (30) 404.2 > 221.1 (35)	424.2 > 250.1 (30)	404.2 > 239.1 (30) 406.2 > 241.1 (30) 424.2 > 250.1 (30)
Zearalenone (ZEA +)	6.6	[M+H] ⁺	20	319.3 > 283.0 (10) 319.3 > 185.1 (30)	337.3 > 301 (10)	319.3 > 283 (10) 337.3 > 301 (10) 336.3 > 300 (10)
Zearalenone ² (ZEA -)	6.8	[M-H] ⁻	20	317.1 > 175.1 (25) 317.1 > 273.1 (20)	335.1 > 185.1 (25)	317.1 > 175.1 (25) 335.1 > 185.1 (25) 334.1 > 184.1 (25)

¹Information in brackets: (Collision energy (eV), bold = Quantifier; IPD: Isotope Pattern Deconvolution.

²Zearalenone analysed by ESI⁻ with a different mobile phase composition compared with the positive run, (see Experimental)

The matrix effect profile at each retention time was constructed by calculating the ratio, at each point of the chromatogram, between the signal intensity (SI) obtained with the sample extract and that of the reference solvent (reagent blank) with the following expression (Equation 1):

$$ME(\%) = \left[\frac{SI(\text{sample extract})}{SI(\text{reference solvent})} \cdot 100 \right] - 100 \quad (1)$$

Once the matrix effect profile is calculated, recoveries corrected for matrix effects can be obtained using the values around the retention time for each compound (Stahnke et al).

2.6 Comparison of quantification approaches

For comparison of different quantification approaches nine mycotoxins were spiked to five food and feed matrices at levels in the range of legislative or recommended maximum levels.

For maize, compound feed and straw 2.5 g were fortified with 625 μL of the working solution of unlabelled mycotoxins. For nutmeg and curcuma 0.5 g were spiked with 125 μL of the same solution. The concentration in fortified samples was established as level 0 (L0), which corresponded to following concentration of mycotoxins in samples: AFB₁, 0.005 $\mu\text{g/g}$; DON, 1 $\mu\text{g/g}$; FB₁, 0.5 $\mu\text{g/g}$; FB₂, 0.2 $\mu\text{g/g}$; FB₃, 0.1 $\mu\text{g/g}$; HT-2, 0.1 $\mu\text{g/g}$; OTA, 0.01 $\mu\text{g/g}$; T-2, 0.1 $\mu\text{g/g}$; ZEA, 0.25 $\mu\text{g/g}$. Samples were equilibrated for 30 min before the extraction.

When measurements involved the use of the labelled mycotoxins, one aliquot of 200 μL of the initial extract was spiked with 20 μL of the labelled mixture and diluted with 180 μL of deionized water.

The fortified samples were quantitatively analysed on three different days. From the data obtained the average recovery and the precision (expressed as

relative standard deviation (RSD) in %) were determined using five different calibration approaches:

a) Multi-level external calibration using isotopically labelled internal standards.

For this 20 µL of the labelled mycotoxin mix was added to 200 µL of the sample extract and deionized water was added to obtain a final volume of 400 µL. Calibration standards in extraction solvent/water (1/1) were prepared containing the mycotoxins at concentrations corresponding to 0, 0.5, 1, 2.5 and 10 times the concentration corresponding to L0 in sample and the isotopically labelled internal standards at the same level as in the final sample extracts. The response of the mycotoxin was normalized to that of the corresponding labelled internal standard. The concentration of the mycotoxins were determined using the equation of the calibration curve obtained using the normalized responses. For comparison, the calculations were also done without using the labels (i.e. without correction for matrix effects).

b) Multi-level standard addition

Four aliquots from the same sample extract were used to perform the recovery calculations based on standard additions. These were prepared by adding successively the mixture of the natural compounds to 200 µL of extract of the fortified samples to obtain a final level of 1.5 times (level 1, L1), 3 times (level 2, L2) and 4.5 times (level 3, L3) the level added to the spiked samples (L0). Deionized water was added to obtain a final volume of 400 µL. The concentration of mycotoxin was determined from the intercept of the calibration curve with the X-axis.

c) Single-level standard addition

For this quantification method the data from b) were used. The concentration

was calculated by:

$$\text{Concentration} = \frac{\text{Area}L_x}{\text{Area}L_x - \text{Area}L_0} \cdot \text{Concentration } L_x \quad (2)$$

with L_x being the standard addition level, and L_0 the level in the fortified sample. This single-point standard addition calibration was performed for each of the three levels individually.

d) One-point isotopic internal calibration (OPIC)

One isotopically labelled standard for each compound and a simple cross-multiplication is used to determine the concentration in the extracts for each sample injection. No calibration curve is used. For this 20 μL of the labelled mycotoxin mix was added to 200 μL of the extract (blank or fortified) and deionized water was added to obtain a final volume of 400 μL . The concentration of the isotopically labelled internal standards in the extract corresponded to that of the fortification levels in the samples. The concentration of the mycotoxin was calculated by:

$$\text{Concentration (OPIC)} = \frac{\text{Area}M_x}{\text{Area}M_{xl}} \cdot \text{Concentration } M_{xl} \quad (3)$$

with M_x = mycotoxin, M_{xl} = labelled mycotoxin

e) Isotope pattern deconvolution (IPD).

IPD as used in this work is an alternative form of OPIC. IPD is a mathematical tool employed in IDMS to obtain the concentration of each compound in the sample by multiple linear regressions without the need to build any calibration curve. This approach assumes that, after spiking the sample with the labelled analogue, the final isotopic composition observed in the mixture is a combination of the analyte and the isotopically enriched spike. Afterwards, solving the system of equations formed by the abundances, the ratio of molar fractions is obtained and consequently the concentration of analyte in sample.

This approach needs the measurement of the isotopic composition of both natural and labelled compounds by mass spectrometry [25]. Taking into account the limited number of transitions that can be simultaneously measured by LC-MS/MS, the most sensitive transitions should be known in advance. It is possible to calculate the most abundant isotopomer combination for a selected transition by the use of the software Isopatrn [26] but the molecular formula of both parent and daughter ions must be available. The proposed molecular formula has been obtained by either previous works [17,27,28] or deduced by using Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) and was double checked with in-house exact mass databases (Table S1. Appendices). The selected transitions for IPD calculations are included in Table 1. For IPD calculations 3 transitions are used: the most abundant for natural and labelled compounds and a third one, sensitive enough and free of interferences. A minimum number of three transitions is necessary in order to be able solve the system of equations formed by the abundances by multiple linear regression with a least square fitting.

$$\begin{bmatrix} A_{mix}^{SRM1} \\ A_{mix}^{SRM2} \\ A_{mix}^{SRM3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^{SRM1} & A_{lab}^{SRM1} \\ A_{nat}^{SRM2} & A_{lab}^{SRM2} \\ A_{nat}^{SRM3} & A_{lab}^{SRM3} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X_{nat} \\ X_{lab} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^{SRM1} \\ e^{SRM2} \\ e^{SRM3} \end{bmatrix} \quad (4)$$

In this system of equations A_{mix}^{SRMi} values corresponds to the measured relative abundance of the compound in the mixture for the SRM transition of nominal masses $i > j$, A_{nat}^{SRMi} and A_{lab}^{SRMi} experimentally measured abundances for the natural and labeled micotoxins and $e^{i>j}$ is the error vector of the multiple linear regression. By solving the previous system of equations, the amount (mols) of natural abundance mycotoxin in the sample, N_{nat} , is then calculated using equation (5) where the amount (mols) of each labeled mycotoxins added, N_{lab} , must be known.

$$N_{nat} = N_{lab} \frac{X_{nat}}{X_{lab}} \quad (5)$$

It should be noted the probability of errors caused by the contribution of fragmentation before Q1. For example the transition 319→283, which starts at the [M+H] of native zearalenone may be theoretically influenced by the fragment ion [M+H-H₂O]⁺ of ¹³C₁₈-ZEA. However, our measurements will be biased only if [M+H-H₂O] of ¹³C₁₈-ZEA has also a main fragment in Q2 of m/z 283 (see Table 1).

The samples used for this study turned out to be contaminated with certain mycotoxins (see Supplemental Info Table S2). In these cases, the amount present in the non-fortified samples was subtracted from that of the fortified samples in all quantification approaches. Since no blank samples were available for the majority of the matrices, an unspiked sample was prepared for each matrix. A volume of 200 µL of the final extract was fortified with 20 µL of the labelled mixture and 180 µL of water in order to be able to subtract the amount of each mycotoxin found in the samples by all the quantification methodologies.

2.7 Determination of matrix effects by post-extraction addition

Matrix effects were calculated by comparison of the response of a mycotoxin in sample extract with the response of the same concentration in a solvent standard. This was done at the L2 level. Endogenous concentrations of mycotoxins in the samples were taken into account (subtracted) in the calculations.

$$ME = \frac{\text{Area}(\text{matrix})}{\text{Area}(\text{solvent})} \cdot 100 - 100 \quad (6)$$

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Assessment of the feasibility of compensation of matrix effects through the signal of a continuously monitored substance

The work of Stahnke et al. establishes that the ion suppression or enhancement for a monitored substance can be extrapolated to other analytes if they elute at the same retention time, and therefore can be used to correct for matrix effects. To study the applicability of this approach, three 'matrix-marker' substances (^{13}C -caffeine, carbendazim and chlormequat) were tested. In this work, in order not to complicate the instrumental configuration, the substances were added to the mobile phase rather than by post-column infusion as done by Stahnke et al. At least one injection for stabilization of the system when starting a new sequence was performed. By doing so, no indications for concentration fluctuations of the marker substance due to absorption in the LC-pump or valve were observed. First the signal intensities of the three substances during the entire chromatographic run were measured without matrix (injection of reagent blank, see Figure 1A). This basically shows the effect of the mobile phase gradient on the response of each of the three substances. Next, the signal intensities were measured after injection of extracts of different matrices known to cause moderate to strong matrix effects (a soy by-product used as feed ingredient, wheat straw, nutmeg (shown in Figure 1B), paprika, curcuma and ginger). Then the matrix effect profiles were constructed based on the ratio of the signals obtained after injection of sample extract and reagent blank versus retention time (Figure 1C for nutmeg, Figure 2 for curcuma and wheat straw, more examples in the Supplemental Information Figure S1). One limitation of the set up to add the substances to the mobile phase (instead of post-column infusion) was that due to the interaction of carbendazim and ^{13}C -caffeine with the stationary phase (retention time 2.8 and 3.3 min, respectively), these compounds were initially accumulated in the column until their constant elution. For this reason, the usable matrix-effect profiles ranged from 3.5 to 9 min.

The graphs very nicely show that the matrix effects, mostly suppression, varies widely for different matrices and at different retention times. The objective of these graphs was to obtain the matrix effect values at the retention time of each of the mycotoxins and then use these values to correct for the matrix effect. The first observation that can be made from the matrix-effect profiles for the three marker substances is that they overlap to a certain extent, but not consistently, and that remarkable differences do occur. For example, in Figure 2A in the elution range of the mycotoxins (up to approx. 7 min) the magnitude of suppression for carbendazim and ^{13}C -caffeine is similarly strong, but much less suppression occurs for chlormequat. The different values obtained between chlormequat and the other two compounds can be explained, at first, by the different physicochemical properties since chlormequat is a highly ionized compound. However, for wheat straw, ^{13}C -caffeine and chlormequat are overlapping quite well while carbendazim is clearly more suppressed. In certain matrices and at certain retention times, very large variations in matrix effects between the three marker substances can be seen, for example for ginger (Figure S1) at 5.0 min, the suppression of ^{13}C -caffeine and chlormequat is similar and carbendazim is deviating, while at 5.5 min ^{13}C -caffeine and carbendazim are similar and chlormequat is deviating.

These differences cannot be readily explained by the physico-chemical properties of the monitored compounds. In Figure 1C, 2 and S1 the actual matrix effects for individual mycotoxins, determined by comparison of the response in matrix versus the response in solvent standards, are also included. From this it is clear that similar observations can be made for the other mycotoxins and matrices (see Figure 1C, Figure 2). Also for mycotoxins that co-elute (e.g. aflatoxin B1 and HT-2 toxin) substantial differences occur (see also Table 2 and 3, and Table S2-4). The results demonstrate that the correction of the matrix effect by monitoring a 'matrix-marker' substances is an unsuitable approach for the correction of matrix effects for the tested conditions.

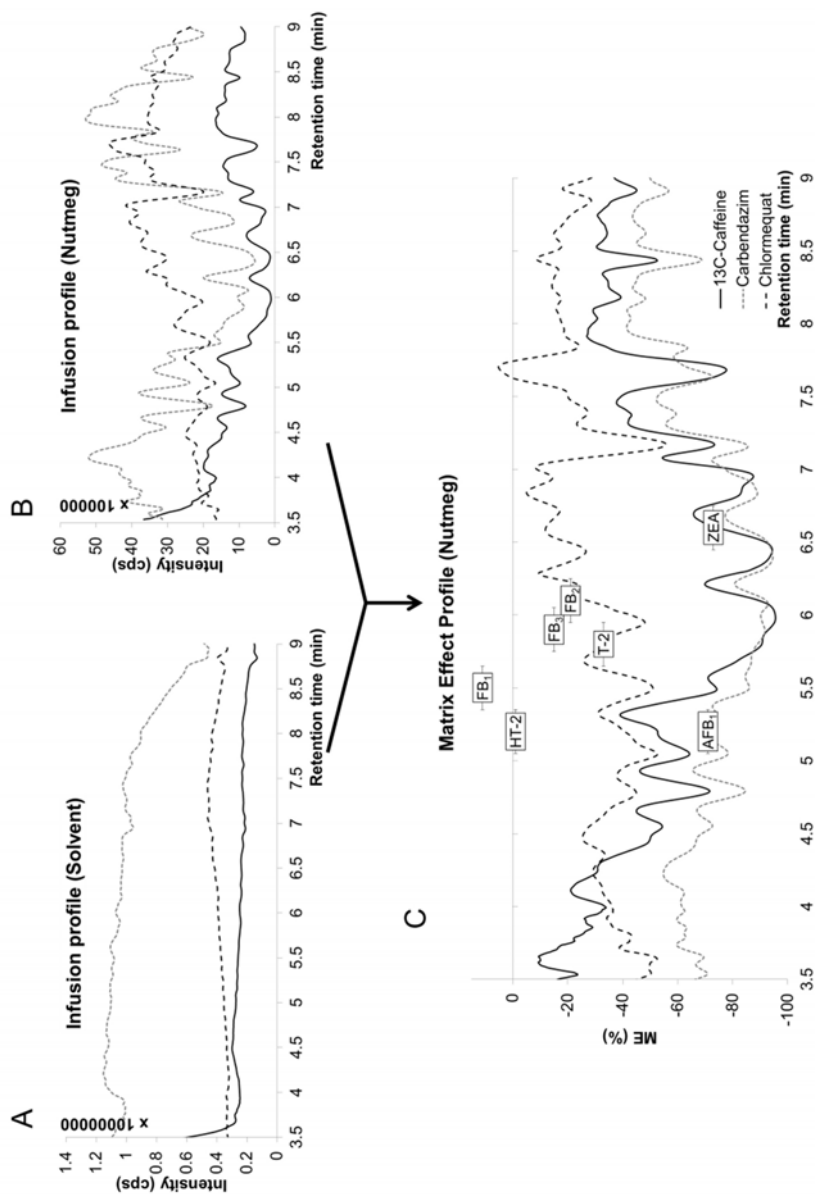


Figure 1. (A) Signal profile for ¹³C-caffeine, carbendazim and chlormequat after the injection of the reference solvent and (B) after the injection of a nutmeg extract in a second run. (C) Matrix Effect Profile calculated as the ratio of the two infusion profiles together with the matrix effects obtained by post-extraction addition at each retention time for each mycotoxin. Boxes with the mycotoxin code: position on the Y-axis indicate the actual suppression/enhancement for that mycotoxin, the lines on either side of the box indicate its peak width.

Although the approach seems appropriate for the pesticides and matrices from the work by Stahnke, it was not suited for the mycotoxins and matrices studied in the present work. The reasons for this were not fully clear, but might be related to the type of matrix, the higher degree of suppression (especially spices) and/or the instrumental conditions used. However, the method provides a qualitative assessment of the matrix effect and enables the researcher to evaluate the alteration of the analyte response at each retention time.

3.2 Comparison of different calibration approaches

In the comparison nine mycotoxins (AFB₁, DON, FB₁, FB₂, FB₃, HT-2, OTA, T-2 and ZEA) were selected based on the availability of the isotopically labelled analogues of the sought compounds and, except for FB₃, their inclusion in the European Union food legislation. Maize, compound feed, straw, nutmeg and curcuma were selected due to their known moderate to high signal suppression. The average matrix effects and its variability (standard deviation) for the different mycotoxin/matrix combinations as measured on three different days are included in Table 2 (maize), Table 3 (nutmeg), Table S3 (compound feed), Table S4 (wheat straw), and Table S5 (curcuma). Matrix effects were calculated according to equation 6.

To this end, the ratio between the areas of the standard prepared in solvent and in sample extract were compared. In view of these results, the compounds affected by a higher suppression were aflatoxin B1 and deoxynivalenol for all the matrices. Moreover, the signal of zearalenone was also affected by the matrix of both studied spices, while T-2 toxin and Ochratoxin A were mostly affected by curcuma matrix. In general, matrix effects for all analytes were more pronounced in spice samples, in particular curcuma, than in maize, compound feed or straw. Malachova et al. have previously reported this in green pepper [29].

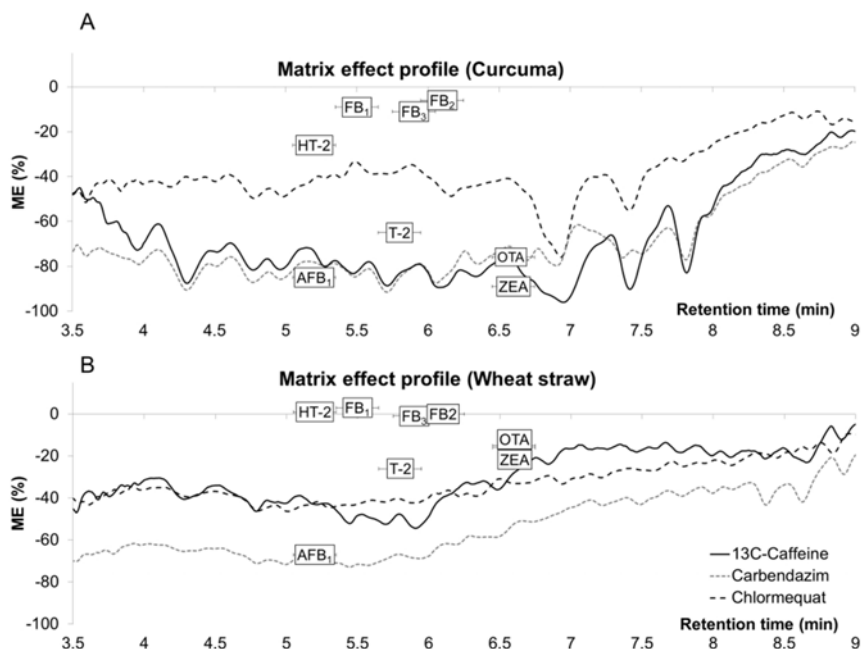


Figure 2. Matrix effect profile for curcuma (A) and for wheat straw (B). The matrix effects obtained by post-extraction addition at each retention time for each mycotoxin are also included. Boxes with the mycotoxin code: position on the Y-axis indicate the actual suppression/enhancement for that mycotoxin, the lines on either side of the box indicate its peak width.

For the evaluation of trueness, samples were spiked with working solution (unlabelled mycotoxins) at one level before extraction. The concentration levels were selected according to typical legislative or recommended limits and were established as level 0 (L0) (see experimental section for specific values).

Recoveries of the selected mycotoxins were first calculated by the standard addition method (addition to the extract). As the quantification is carried out in the same matrix, the standard addition method compensates for any matrix effect and the extraction recovery can be assessed. The standard addition calculations were performed by adding the working solution of natural mycotoxins to different aliquots of the same extract to obtain a final level of 1.5

times (level 1, L1), 3 times (level 2, L2) and 4.5 times (level 3, L3) the level spiked to sample (L0). This permitted to obtain a four-point calibration graph built with the spiked sample and the three post-extraction levels. Moreover, the recoveries were also calculated based on single standard addition using each of the three levels.

Alternatively, the isotope-labelled mycotoxins, added to an extract aliquot of L0, were used as internal standard for calculating the recoveries by a five-point calibration curve in solvent, and by two single-point calibration approaches: one point isotopic internal calibration (OPIC) and isotope pattern deconvolution (IPD) (see experimental section for details). The main difference between the single-point calculations is the use of three isotopomer abundances in a multiple linear regression (IPD) instead of a cross-multiplication (OPIC) to determine the concentration in the sample.

Satisfactory linearity by standard addition and internal standard calibration curve with correlation coefficients above 0.995 in all sample matrices was obtained, except for OTA in straw and curcuma for the standard addition method. For this reason this analyte was excluded in the comparison by standard additions (either, multiple or single addition) in straw and curcuma. Besides, OTA was affected by a co-eluting isobaric interference in nutmeg samples. Finally, due to the lower sensitivity in curcuma samples, no second transition, needed for IPD calculations, was observed and consequently the recovery calculations could not be performed. All the difficulties regarding OTA calculations were related to the low levels and lower sensitivity (partly due to the high suppression) of this compound.

Trueness and precision

Regarding the three-day recovery study, the trueness (recovery) and precision are shown in Tables 2 and 3 and Tables S-3 to S-5 for maize, nutmeg, compound feed, straw and curcuma respectively. Recovery and precision are assessed according to 519/2014[30] The recovery requirements in this

regulation vary for the different mycotoxins and concentrations (for the fortification levels in this work: 50-120% for aflatoxin B1, 60-130% for T2/HT2-toxins, 60-120% for fumonisins, 70-120% for deoxynivalenol and Zearalenone, and 70-110% for ochratoxin A). For precision the repeatability (RSD_r) requirement from 519/2014 were used, even though the data were generated under within-lab reproducibility conditions. The RSD_r requirements vary for the different mycotoxins and range from 20-30%. For the standard addition method, recoveries and RSD_r met the requirements in all cases with the following exceptions: ochratoxin A in maize (Table 2), deoxynivalenol, Aflatoxin B1, and zearalenone in straw (Table S4). Quantification methods based on a single-level standard addition can provide appropriate results except when the addition level is too close to the level present in the sample. Here that was the case for level L1 resulting in a small response difference with L0. Minor variations in response of in either L0 or L1 will lead to wide variations in the analysis result. This explains the high RSD values and the recoveries outside the EU 519/2014 acceptance criteria. As long as the addition is 3 or 4.5 times the level in the sample, similar results were obtained as compared to multi-level standard addition.

Table 2. Matrix effect and recoveries^a in percentage of mycotoxins in **maize** using different calibration approaches.

Compound	Matrix effect±SD	Multi-level calibration			Single-level calibration				
		Solvent STD w/o IL-IS	Solvent STD with IL-IS	L1-L3	L1	L2	L3	OPIC	IPD
Recovery (RSD) n=3, three different days)									
Deoxynivalenol	-21 ± 16	67 (26)	91 (14)	93 (3)	78 (11)	87 (7)	89 (6)	102 (14)	95 (14)
Aflatoxin B ₁	-41 ± 14	59 (19)	110 (8)	108 (18)	90 (40)	102 (24)	103 (20)	109 (11)	117 (9)
HT-2 toxin	21 ± 13	99 (11)	108 (20)	95 (10)	100 (25)	90 (22)	94 (14)	103 (25)	114 (25)
Fumonisin B ₁	2 ± 28	74 (35)	99 (16)	80 (12)	60 (13)	73 (10)	75 (10)	121 (10)	111 (10)
T-2 toxin	3 ± 13	105 (9)	115 (11)	100 (3)	82 (13)	100 (6)	98 (5)	121 (12)	108 (12)
Fumonisin B ₃	4 ± 25	98 (26)	105 (21)	100 (17)	78 (3)	93 (12)	96 (20)	115 (29)	101 (29)
Fumonisin B ₂	9 ± 22	104 (27)	110 (21)	99 (6)	91 (18)	95 (6)	97 (7)	142 (17)	136 (16)
Ochratoxin A	-9 ± 18	95 (26)	113 (10)	92 (29)	145 (66)	90 (15)	94 (19)	127 (18)	131 (19)
Zearalenone	3 ± 7	104 (18)	106 (13)	103 (6)	124 (44)	105 (16)	104 (11)	107 (13)	109 (13)

^aFigures in bold: recoveries or RSDr outside range EU 519/2014.
 STD = standard, IL-IS = isotopically labelled internal standard; L1-L3 standard addition levels (see Experimental); ICAL: Isotopic Internal Calibration, IPD: Isotope Pattern Deconvolution.

Table 3. Matrix effect and recoveries^a in percentage of mycotoxins in **nutmeg** using different calibration approaches

Compound	Matrix effect±SD	Multi-level calibration		Single-level calibration					
		Solvent STD w/o IL-IS	Solvent STD with IL-IS	Standard addition			Internal calibration		
				L1-L3	L1	L2	L3	OPIC	IPD
Recovery (RSD) n=3, three different days									
Deoxynivalenol	-54 ± 5	41 (2)	92 (9)	92 (17)	103 (28)	92 (9)	95 (15)	104 (12)	97 (12)
Aflatoxin B ₁	-71 ± 5	28 (20)	95 (13)	102 (14)	115 (46)	99 (29)	103 (20)	94 (16)	100 (17)
HT-2 toxin	-1 ± 13	85 (9)	103 (6)	94 (3)	128 (32)	95 (18)	102 (5)	98 (10)	107 (9)
Fumonisin B ₁	11 ± 5	97 (10)	90 (9)	95 (25)	115 (30)	89 (12)	102 (29)	108 (20)	99 (20)
T-2 toxin	-33 ± 10	65 (16)	96 (10)	100 (25)	142 (37)	101 (10)	112 (32)	111 (5)	99 (5)
Fumonisin B ₃	-15 ± 9	90 (9)	105 (13)	113 (25)	108 (23)	105 (12)	118 (30)	125 (10)	111 (10)
Fumonisin B ₂	-21 ± 8	72 (1)	104 (7)	90 (23)	94 (13)	92 (12)	93 (21)	125 (9)	120 (9)
Ochratoxin A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zearalenone	-73 ± 4	28 (10)	112 (11)	100 (4)	175 (29)	112 (17)	110 (4)	112 (12)	114 (13)

^aFigures in bold: recoveries or RSDr outside range EU 519/2014. ^bThe chromatographic peak was overlapped by an isobaric interference. STD = standard, IL-IS = isotopically labelled internal standard; L1-L3 standard addition levels (see Experimental); ICAL: Isotopic Internal Calibration, IPD: Isotope Pattern Deconvolution.

Considering that only two injections instead of four for each quantitation were needed for the single-addition method, this approach considerably reduced the total analysis time and could be the best option when no isotopically labelled internal standard is available.

Quantification using the calibration curve with the internal standard method also provided accurate results together with proper precision values. When available, quantification using IL-IS has been demonstrated as a proper alternative to correct matrix effect.

The results obtained using single point calibration (OPIC and IPD), with several recovery values outside the requirements, were worse than expected, although precision was comparable with those based on a calibration curve. One explanation for the observed bias might be deviations in the true concentrations of labelled mycotoxins.

OPIC and IPD should, at first, show some advantages. Standard (labelled compounds) are added to the sample and relative signal (OPIC) or isotopomer abundances (IPD) are directly measured in matrix. Thus, the matrix effect should be corrected as in the standard addition method and in external calibration using the isotope labels to normalize the response. On the other hand no calibration curve is used and quantitation can be performed by only one injection per sample, making it a fast method [18–20]. However, incorrect high recoveries were obtained for fumonisins, ochratoxin A and T2-toxin in some of the matrices studied, especially for OPIC method as can be seen in maize (Table 2), nutmeg (Table 3), compound feed (Table S3) and straw (Table S4). In any case, with the exception of FB₂ in maize, FB₂ and FB₃ in nutmeg and the three studied mycotoxins in straw, recoveries (and precision) calculated by IPD and OPIC are comparable to the calibration curve methods but with a considerable reduction of the total analysis time.

The comparison of the different calibration approaches shows that there are various ways to achieve acceptable results. It should be noted that some of the recovery and precision data were affected by the subtraction of the endogenous amount of mycotoxins in samples (see Supplemental Information Table S-2), as no blank samples were available, and to the fact that the additions (standard additions or internal standard) were performed to the final extract rather than to the sample itself. Thus, the sample treatment process effect on precision was not corrected. However, post-extraction addition is a less expensive method, since lower quantities can be added, especially for the expensive labelled mycotoxins.

4. CONCLUSIONS

An exhaustive study on the extent of matrix effects and applicability of four mathematical methodologies for their correction in LC-ESI-MS/MS mycotoxins analysis in challenging matrices has been reported. The correction of the matrix effect by monitoring the signal of a continuously added substance was studied but without satisfactory results. The assumption that the matrix effect for a monitored compound can be extrapolated to other analytes if it occurs at the same retention time is not applicable for the mycotoxins and matrices in the present study. Otherwise, this approach permitted a qualitative evaluation of the signal suppression and enhancement phenomena at each retention time.

The evaluation of absolute matrix effects exhibited by the electrospray source in the LC-MS/MS system showed that the signal was particularly suppressed in spice samples. Generally, DON and AFB₁ were the analytes affected by the highest suppression.

The majority of recovery and RSD values were between 70-120% and below 20%, respectively, for the standard addition method (both for multiple or single addition at adequate concentration levels) and when using a calibration

curve with an isotopically labelled internal standard. Thus, those methodologies all compensate sufficiently for the matrix effect, and trueness and precision meet the EU 519/2014 acceptance criteria. When suitable internal standards are not available, single-level standard addition methods can be the choice as it reduces considerably the total analysis time.

This study has also demonstrated that single-point calibration approaches (OPIC and IPD) provide similar results, in terms of recovery and precision, to the values obtained with the whole calibration curve. Nevertheless, recoveries for single-point calculations with isotope labelled internal standards occasionally led to unacceptable high recoveries.

Further verification of the trueness of the concentration of the labelled mycotoxin solutions is needed to resolve this given that those methods are the fastest (only one injection per sample is needed) and can correctly compensate the matrix effect.

ACKNOWLEDGEMENT

The Dutch Ministry of Economic Affairs is acknowledged for financially supporting this work. The authors acknowledge the financial support from Generalitat Valenciana (Research group of excellence Prometeo 2009/054 and Collaborative Research on Environment and Food Safety ISIC/2012/016). N.Fabregat-Cabello also acknowledges the Generalitat Valenciana for her Ph.D. research grant under the Program VALi+D.

REFERENCES

- [1] J.W. Bennett, M. Klich, *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2003). 497-516.
- [2] F. Fung, R.F. Clark, *Clin. Toxicol.* 42 (2004) 217–234.
- [3] European Commission (EC) 2002, Commission Directive No. 2002/32/EC of 7 May 2002 of the European Parliament and of the Council on undesirable substances in animal feed, *Official Journal of the European Communities*, L 140; 10-21.
- [4] European Commission (EC), 2006a. Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Union* L 229: 7–9
- [5] European Commission (EC), 2006b. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union* L 364: 5-24, and amendments thereof:
<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:02006R1881-20140401&rid=1> (accessed 1 June 2014)
- [6] European Commission (EC), 2013. Commission Recommendation 2013/165/EU of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. *Official Journal of the European Union* L 91: 12-15.
- [7] G.S. Shephard, F. Berthiller, P. a. Burdaspal, C. Crews, M. a. Jonker, R. Krska, et al., *World Mycotoxin J.* 6 (2013) 3–30.
- [8] F. Berthiller, P. a. Burdaspal, C. Crews, M.H. Iha, R. Krska, V.M.T. Lattanzio, et al., *World Mycotoxin J.* 7 (2014) 3–33.
- [9] M. Pascale, *Matica srpska Journal for Natural Sciences* (2009) 15–25.
- [10] E. Beltrán, M. Ibáñez, T. Portolés, C. Ripollés, J.V. Sancho, V. Yusà, et al., *Anal. Chim. Acta.* 783 (2013) 39–48.
- [11] P.J. Taylor, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 328–334.
- [12] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, *Talanta.* 115 (2013) 104–122.
- [13] H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, A. Cappiello, S. Geologiche, T. Chimiche, et al., *Mass. Spectrom. Rev.* 30 (2011) 491–509.
- [14] H. Stahnke, S. Kittlaus, G. Kempe, L. Alder, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1474–82.
- [15] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, *75 (2003) 3019–3030.*

- [16] A.K. Hewavitharana, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 359–361.
- [17] E. Varga, T. Glauner, R. Köppen, K. Mayer, M. Sulyok, R. Schuhmacher, et al., *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2675–86.
- [18] F.T. Peters, H.H. Maurer, *Anal. Chem.* 79 (2007) 4967–4976.
- [19] Á. Castillo, E. Gracia-Lor, A.F. Roig-Navarro, J. Vicente Sancho, P. Rodríguez-González, J.I. García Alonso, *Anal. Chim. Acta.* 765 (2013) 77–85.
- [20] A. González-Antuña, J.C. Domínguez-Romero, J.F. García-Reyes, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, et al., *J. Chromatogr. A* 1288 (2013) 40–47.
- [21] H. Stahnke, T. Reemtsma, L. Alder, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2185–2192.
- [22] A. Roland, P. Bros, A. Bouisseau, F. Cavalier, R. Schneider, *Anal. Chim. Acta.* 818 (2014) 39–45.
- [23] E. Beltrán, M. Ibáñez, J.V. Sancho, F. Hernández, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 1801–1809.
- [24] A. De Girolamo, M. Solfrizzo, V.M.T. Lattanzio, J. Stroka, A. Alldrick, H.P. van Egmond, et al., *World Mycotoxin J.* 6 (2013) 317–334.
- [25] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, G. Centineo, J.I. García Alonso, (2010) 953–964.
- [26] L. Ramaley, L. Cubero Herrera, *Rapid Commun. Mass Sp.* 22 (2008) 2707–2714.
- [27] K. Tóth, L. Nagy, A. Mándi, Á. Kuki, M. Mézes, M. Zsuga, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 27 (2013) 553–559.
- [28] M. Bartók, T., Szécsi, Á., Szekeres, A., Mesterházy, Á., Bartók, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2447–2462.
- [29] A. Malachová, M. Sulyok, E. Beltrán, F. Berthiller, R. Krska, *J. Chromatogr. A.* 1362 (2014) 145–156.
- [30] European Commission (EC), 2014, Commission Regulation (EU) No 519/2014 of 16 May 2014 amending Regulation (EC) No 401/2006 as regards methods of sampling of large lots, spices and food supplements, performance criteria for T-2, HT-2 toxin and citrinin and screening methods of analysis.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Table S - 1. Name, selected reaction monitoring (SRM) transition and formula for precursor for the natural and isotopically labelled mycotoxin.

Name	SRM transition		Precursor ion	Product ion
	Natural	U-Labelled ¹		
Deoxynivalenol (ESI+)	297.0 > 249.1	312.0 > 263.1	[C ₁₅ H ₂₀ O ₆ +H] ⁺	[C ₁₄ H ₁₆ O ₄ +H] ⁺
Aflatoxin B ₁ (ESI+)	313.1 > 285.1	330.1 > 301.1	[C ₁₇ H ₁₂ O ₆ +H] ⁺	[C ₁₆ H ₁₂ O ₅ +H] ⁺
HT-2 Toxin(ESI+)	442.2 > 263.1	464.2 > 278.1	[C ₂₂ H ₃₂ O ₈ +NH ₄] ⁺	[C ₁₅ H ₁₇ O ₃ +NH ₄] ⁺
Fumonisin B ₁ (ESI+)	722.2 > 334.2	756.2 > 356.2	[C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅ +H] ⁺	[C ₂₂ H ₃₉ NO+H] ⁺
T-2 Toxin (ESI+)	484.2 > 185.1	508.2 > 198.1	[C ₂₄ H ₃₄ O ₉ +NH ₄] ⁺	[C ₁₃ H ₁₁ +NH ₄] ⁺
Fumonisin B ₃ (ESI+)	706.2 > 336.2	740.2 > 358.2	[C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄ +H] ⁺	[C ₂₂ H ₄₁ NO+H] ⁺
Fumonisin B ₂ (ESI+)	706.2 > 336.2	740.2 > 358.2	[C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄ +H] ⁺	[C ₂₂ H ₄₁ NO+H] ⁺
Ochratoxin A (ESI+)	404.2 > 239.1	424.2 > 250.1	[C ₂₀ H ₁₈ Cl NO ₆ +H] ⁺	[C ₁₁ H ₈ ClO ₄ +H] ⁺
Zearalenone (ESI+)	319.3 > 283	337.3 > 301	[C ₁₈ H ₂₂ O ₅ +H] ⁺	[C ₁₈ H ₁₈ O ₃ +H] ⁺
Zearalenone (ESI-)	317.1 > 175.1	335.1 > 185.1	[C ₁₈ H ₂₁ O ₅] ⁻	[C ₁₀ H ₁₈ O ₃] ⁻

¹U-labelled stands for uniformly ¹³C-labelled mycotoxins

Table S -2. Concentration obtained in positive samples by single-level standard addition.

Compound	Maize (mg/Kg)	Compound feed (mg/Kg)	Straw (mg/Kg)	Nutmeg (mg/Kg)	Curcuma (mg/Kg)
Deoxynivalenol	0.15 ± 0.04	0.17 ± 0.06	1.05 ± 0.15	n.d.	n.d.
Aflatoxin B ₁	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HT-2 toxin	0.022 ± 0.010	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fumonisin B ₁	0.67 ± 0.17	0.15 ± 0.03	n.d.	n.d.	n.d.
T-2 toxin	0.013 ± 0.005	n.d.	n.d.	n.d.	n.d. n.d.
Fumonisin B ₃	0.046 ± 0.016	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Fumonisin B ₂	0.13 ± 0.03	0.056 ± 0.009	n.d.	n.d.	n.d.
Ochratoxin A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Zearalenone	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.11 ± 0.03

^aThe uncertainty of the values corresponds to 1s standard deviation. n.d.=non detected

Table S - 3. Matrix effect and recoveries in percentage of mycotoxins in **compound feed** using different calibration approaches.

Compound	Matrix effect=SD	Multi-level calibration		Single-level calibration					
		Solvent STD w/o IL-IS	Solvent STD with IL-IS	L1-L3	L1	L2	L3	OPIC	IPD
Recovery (RSD) n=3, three different days)									
Deoxynivalenol	-58 ± 6	42 (14)	101 (10)	97 (7)	113 (25)	102 (5)	96 (12)	112 (4)	105 (4)
Aflatoxin B ₁	-37 ± 11	63 (16)	105 (19)	92 (8)	104 (38)	100 (14)	94 (7)	103 (13)	110 (14)
HT-2 toxin	5 ± 20	103 (6)	113 (17)	92 (10)	117 (17)	108 (14)	97 (7)	107 (16)	118 (14)
Fumonisin B ₁	-6 ± 22	73 (21)	85 (18)	81 (5)	79 (18)	79 (9)	73 (8)	104 (12)	95 (12)
T-2 toxin	-10 ± 21	100 (23)	111 (16)	98 (16)	111 (52)	114 (29)	99 (20)	126 (17)	112 (17)
Fumonisin B ₃	-10 ± 15	93 (24)	101 (26)	81 (11)	111 (38)	101 (12)	84 (15)	119 (3)	106 (2)
Fumonisin B ₂	1 ± 5	93 (19)	86 (14)	89 (9)	92 (13)	92 (13)	84 (15)	111 (16)	107 (15)
Ochratoxin A	-12 ± 15	108 (10)	116 (35)	77 (4)	486 (117)	107 (6)	90 (14)	129 (24)	134 (23)
Zearalenone	-11 ± 16	92 (18)	95 (16)	95 (14)	106 (26)	109 (8)	95 (13)	97 (12)	98 (12)

^aFigures in bold: recoveries or RSDr outside range EU 519/2014.

STD = standard, IL-IS = isotopically labelled internal standard; L1-L3 standard addition levels (see Experimental); ICAL: Isotopic Internal Calibration, IPD: Isotope Pattern Deconvolution.

Table S - 4. Matrix effect and recoveries in percentage of mycotoxins in wheat **straw** using different calibration approaches.

Compound	Matrix effect±SD	Multi-level calibration		Single-level calibration					
		Solvent STD w/o IL-IS	Solvent STD with IL-IS	Standard addition			Internal calibration		
				L1-L3	L1	L2	L3	OPIc	IPD
Recovery (RSD) n=3, three different days									
Deoxynivalenol	-39 ± 12	72 (35)	103 (27)	120 (28)	114 (9)	109 (16)	109 (21)	116 (29)	108 (29)
Aflatoxin B ₁	-67 ± 5	44 (19)	120 (16)	122 (7)	119 (34)	127 (18)	122 (14)	116 (19)	125 (19)
HT-2 toxin	1 ± 12	117 (22)	108 (4)	106 (8)	136 (25)	114 (7)	108 (10)	106 (9)	118 (9)
Fumonisin B ₁	3 ± 10	107 (20)	121 (20)	96 (23)	102 (22)	97 (9)	95 (11)	144 (6)	131 (6)
T-2 toxin	-26 ± 6	92 (20)	103 (8)	114 (9)	130 (33)	113 (3)	114 (8)	126 (12)	112 (13)
Fumonisin B ₃	-1 ± 9	113 (28)	102 (41)	97 (15)	95 (21)	104 (20)	98 (17)	126 (3)	114 (3)
Fumonisin B ₂	0 ± 10	128 (24)	119 (14)	101 (14)	143 (19)	117 (20)	111 (16)	145 (22)	138 (21)
Ochratoxin A ^b	-16 ± 15	117 (30)	98 (10)	-	-	-	-	121 (18)	128 (14)
Zearalenone	-15 ± 17	109 (18)	89 (13)	127 (21)	137 (41)	125 (3)	123 (8)	95 (18)	97 (18)

^aFigures in bold: recoveries or RSD: outside range EU 519/2014. ^bUnsatisfactory linearity were obtained for standard addition method
 STD = standard, IL-IS = isotopically labelled internal standard; L1-L3 standard addition levels (see Experimental); ICAL: Isotopic Internal Calibration, IPD: Isotope Pattern Deconvolution.

Table S-5. Matrix effect and recoveries in percentage of mycotoxins in **curcuma** using different calibration approaches

Compound	Matrix effect±SD	Multi-level calibration			Single-level calibration					
		Solvent STD w/o IL-IS	Solvent STD with IL-IS	Standard addition			Internal calibration			
				L1-L3	L1	L2	L3	OPIC	IPD	
Recovery (RSD) n=3, three different days)										
Deoxynivalenol	-42 ± 5	56 (11)	95 (10)	92 (9)	104 (22)	99 (5)	95 (2)	108 (16)	100 (16)	
Aflatoxin B ₁	-85 ± 1	13 (26)	107 (26)	100 (19)	69 (29)	88 (18)	92 (23)	111 (39)	119 (36)	
HT-2 toxin	-26 ± 12	56 (17)	101 (20)	91 (16)	81 (53)	84 (36)	86 (28)	96 (14)	106 (13)	
Fumonisin B ₁	-9 ± 9	82 (15)	65 (35)	77 (13)	102 (30)	92 (13)	84 (15)	84 (29)	77 (29)	
T-2 toxin	-65 ± 1	36 (6)	88 (6)	97 (13)	100 (39)	107 (9)	97 (9)	102 (6)	91 (6)	
Fumonisin B ₃	-11 ± 12	80 (10)	86 (35)	85 (25)	101 (25)	89 (7)	88 (12)	109 (28)	99 (29)	
Fumonisin B ₂	-6 ± 9	91 (11)	80 (34)	94 (11)	120 (17)	98 (3)	99 (9)	95 (37)	90 (37)	
Ochratoxin A	-76 ± 11	21 (20)	92 (18)	-	-	-	-	84 (48)	- ^c	
Zearalenone	-89 ± 4	6 (34)	77 (11)	82 (4)	86 (22)	76 (12)	77 (7)	96 (11)	100 (11)	

^aFigures in bold: recoveries or RSDr: outside range EU 519/2014. ^bUnsatisfactory linearity were obtained for standard addition method. ^cNo second transition available for IPD calculations.

STD = standard, IL-IS = isotopically labelled internal standard; L1-L3 standard addition levels (see Experimental); ICAL: Isotopic Internal Calibration, IPD: Isotope Pattern Deconvolution.

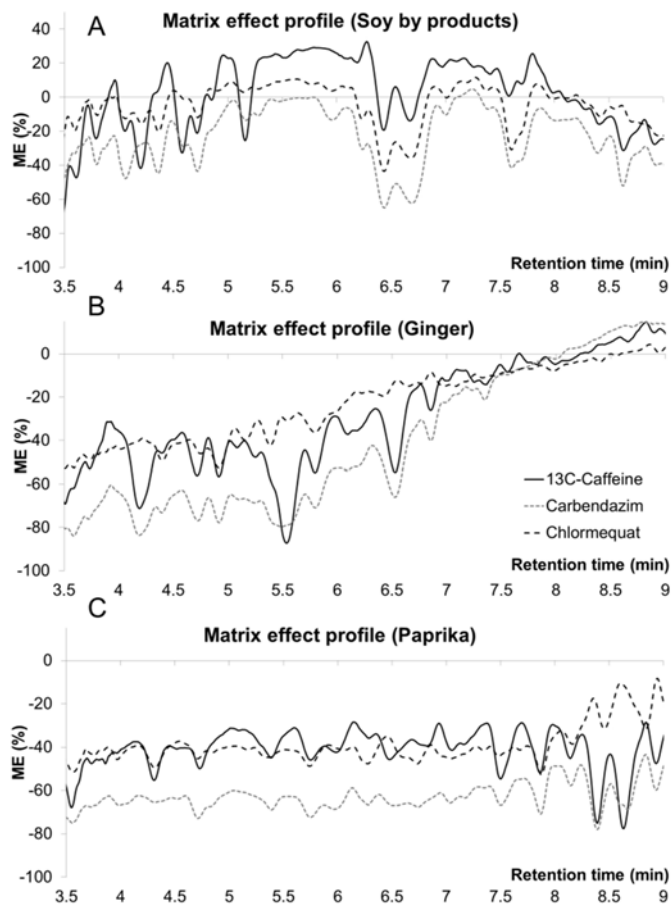


Figure S - 1. Matrix effect profile for (A) soy by-products, (B) ginger and (C) paprika.

4.3 Bibliografía

1. Bennett, J. W. & Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, (2003).
2. IARC. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 56, Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Amines and Mycotoxins.* 245–489 (IARC Press, 1993).
3. IARC. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 82, Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene.* 169–366 (IARC Press, 2002).
4. Fung, F. & Clark, R. F. Health Effects of Mycotoxins: A Toxicological Overview. *Clin. Toxicol.* **42**, 217–234 (2004).
5. Beltrán, E. *et al.* Development of sensitive and rapid analytical methodology for food analysis of 18 mycotoxins included in a total diet study. *Anal. Chim. Acta* **783**, 39–48 (2013).
6. European Commission (EC), 2006c. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union L 364: 5-24, and amendments thereof: Off. J. Eur. Union* (2006). at <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:02006R1881-20140401&rid=1>>
7. European Commission (EC), 2006b. Commission Recommendation 2006/576/EC of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Official Journal of the European Uni.* (2006).

8. European Commission (EC), 2013. Commission Recommendation 2013/165/EU of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products. *Official Journal of the European Union L 91: 12-15*. **9**, (2013).
9. COMMISSION REGULATION (EU) No 574/2011 of 16 June 2011. *Off. J. Eur. Union* **8**, 7-24 (2011).
10. Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C. & Jonker, M. a. Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 147-157 (2007).
11. U.S. Food & Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition. Compliance Program guidance manual. Compliance Program Guide 7307.001 Mycotoxins in Domestic and Imported Foods, (2008).
12. Shephard, G. S. Determination of mycotoxins in human foods. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 2468-2477 (2008).
13. Journal, W. M. Foreword: rapid methods for mycotoxin detection. *World Mycotoxin J.* **7**, 401-405 (2014).
14. Mol, H. G. J. *et al.* Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Anal. Chem.* **80**, 9450-9 (2008).
15. Sulyok, M., Krska, R. & Schuhmacher, R. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 1505-1523 (2007).

16. Furey, A., Moriarty, M., Bane, V., Kinsella, B. & Lehane, M. Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta* **115**, 104–122 (2013).
17. Trufelli, H. *et al.* An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass. Spectrom. Rev.* **30**, 491–509 (2011).
18. Stahnke, H., Reemtsma, T. & Alder, L. Compensation of matrix effects by postcolumn infusion of a monitor substance in multiresidue analysis with LC-MS/MS. *Anal. Chem.* **81**, 2185–2192 (2009).
19. Beltrán, E., Ibáñez, M., Sancho, J. V. & Hernández, F. Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **23**, 1801–1809 (2009).

Capítulo 5

Conclusiones



Conclusiones

De la presente tesis doctoral se puede extraer a modo de **conclusión general** que las ventajas del análisis por dilución isotópica elemental se pueden extrapolar al análisis de compuestos orgánicos, incluyendo la metodología de cálculo basada en la deconvolución de perfiles isotópicos. Para llegar a tal conclusión, la aplicación de esta metodología ha sido llevada a cabo en diferentes tipos de matrices y analizadores, haciendo uso en todos los casos del potencial del acoplamiento entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas.

A pesar de que las conclusiones han sido presentadas de forma detallada en cada uno de los capítulos incluidos en este trabajo, a continuación se van a recopilar las **conclusiones específicas** más destacables:

1. La aplicación de dos ciclos consecutivos de extracción a baja y a alta temperatura para llevar a cabo la extracción mediante microondas focalizadas ha permitido la extracción cuantitativa del cromo hexavalente en muestras sólidas. Además, la adición de complejantes en medio básico ha facilitado la extracción de la especie trivalente de cromo en forma de Cr(III)-EDTA.
2. Se ha demostrado que en las condiciones de extracción estudiadas para las especies de cromo, la especie Cr(III) está estabilizada. Este hecho permite el uso de un solo trazador isotópico de Cr(VI), pudiéndose simplificar de forma notable la complejidad y el coste del análisis. En consecuencia, la metodología desarrollada puede ser aplicada en análisis de rutina, manteniendo los mismos niveles de exactitud y precisión que utilizando dos trazadores.
3. La metodología desarrollada para la determinación de Cr(VI) en sólidos ha sido validada satisfactoriamente por LC-ICP-MS mediante el análisis de cuatro materiales de referencia certificados: SRM 2701 y SRM 2700 (suelo contaminado a alto y bajo nivel de concentración), CRM071 (arcilla arenosa) y BCR-545 (polvo contenido en un filtro). También se

han realizado los correspondientes análisis para estudiar las interconversiones entre Cr(III) y Cr(VI) en ambos sentidos en distintas condiciones de extracción, para los tres últimos materiales.

4. La aplicación de la cuantificación mediante dilución isotópica y cálculos por IPD se ha trasladado al análisis orgánico, para así evitar las curvas de calibrado y obtener resultados de alta calidad metrológica. Teniendo en cuenta que la obtención de las abundancias teóricas necesarias para los cálculos no es directa en el uso de triples cuadrupolos, se ha recurrido a programas que facilitaban esta tarea (*Isopatrnr*).
5. El uso de compuestos marcados isotópicamente con un solo ^{13}C , para evitar cualquier posible efecto isotópico, se ha evaluado para el caso de dos alquilfenoles en distintas muestras de agua. Dado que estos compuestos no están disponibles de forma comercial, se llevó a cabo su síntesis y caracterización.
6. La aplicación de los compuestos marcados con un solo ^{13}C como patrones internos en la determinación por UHPLC-ESI-MS/MS ha proporcionado resultados con alta calidad (en cuanto a exactitud y precisión) y alta sensibilidad, pues se han alcanzado los niveles regulados tanto para octilfenol como para nonilfenol. Sin embargo, se ha demostrado que otros patrones internos tradicionalmente usados, como el n-nonilfenol, no son adecuados para su uso en aguas residuales.
7. La etapa de preconcentración de disruptores endocrinos en aguas, tanto por técnicas convencionales (extracción en fase sólida) como por otras de más reciente implantación (microextracción en fase líquida utilizando fibras huecas) ha sido clave para alcanzar la sensibilidad necesaria y poder detectar estos analitos, así como del bisfenola A, a niveles de sub-ppb. Por otra parte, HF-LPME ha demostrado ser mucho más eficiente en cuanto a coste y tiempo que SPE, aunque la falta de material para el análisis de rutina aún dificulta su aplicación, así como su complicada manipulación.

8. La evaluación del efecto matriz en el caso del análisis de micotoxinas en alimentos ha sido estudiado de forma clásica (fortificación de los extractos tras la extracción y comparación de los extractos no fortificados) y mediante la monitorización de un compuesto introducido de forma constante a lo largo de todo el cromatograma. Se ha observado que la segunda aproximación no permite la corrección del efecto matriz para los compuestos de interés, aunque ha proporcionado una visión cualitativa de la extensión del efecto matriz a cada tiempo de retención. En general, las micotoxinas deoxinivalenol y aflatoxina B1 han sido las más afectadas por la supresión de señal.
9. La comparación de cinco metodologías de calibrado para compensar el efecto matriz en el análisis de micotoxinas en matrices de alta complejidad (especies y piensos) ha mostrado que cuando los análogos enriquecidos isotópicamente no están disponibles, la aplicación de adiciones estándar a un solo nivel ofrece los resultados con la mayor eficiencia (en relación al coste de materiales y al tiempo de ejecución).
10. El estudio realizado con micotoxinas también ha demostrado que las recuperaciones obtenidas mediante dilución isotópica en un solo punto (IPD) ofrece resultados de la misma calidad (en términos de exactitud y precisión) que el uso de una curva de calibrado completa. No obstante, en algunos casos se han obtenidos recuperaciones anormalmente altas, hecho que debería de ser estudiado en trabajos futuros.

Sugerencias para trabajos futuros

En esta tesis se ha constatado el potencial de la espectrometría de masas de dilución isotópica desarrollada mediante deconvolución de perfiles isotópicos en la obtención rápida de resultados fiables. Como cabe esperar, la optimización de cada método concreto ha puesto de manifiesto la necesidad de abordar nuevos problemas. Este hecho se traduce en una serie de futuros trabajos que no han podido ser llevados a cabo por falta de tiempo y/o material, o por no entrar dentro del alcance de la investigación en curso. A continuación se presentan, resumidos, algunos de los posibles temas de investigación que se han sugerido:

- Estudiar la viabilidad de realizar extracciones de Cr(VI) en muestras sólidas medioambientales utilizando un sistema de microondas convencional en vez del sistema de microondas focalizadas, para facilitar el acceso al método desarrollado.
- Realizar un estudio sobre el isómero de nonifenol más habitual en aguas residuales así como evaluar su efecto disruptor endocrino. De esta forma se podría optar por un análogo marcado isotópicamente probablemente más representativo que el elegido en esta tesis.
- Desarrollar métodos de análisis de alquifenoles en lodos de depuradora ya que tras la depuración de las aguas suelen acumularse en ellos.
- Adaptar, en el campo de la alimentación, los métodos desarrollados para alquifenoles a estudios de migración en envases alimentarios fabricados en plástico.
- Investigar los problemas observados –relacionados con las recuperaciones demasiado elevadas– durante la cuantificación de fumonisinas en alimentos y piensos mediante IPD y OPIC.

Conclusions

As a result of the research performed in this Doctoral Thesis, the **overall conclusion** is that the advantages related to isotope dilution mass spectrometry combined with isotope pattern deconvolution in elemental analysis can be extrapolated to the field of organic analytical chemistry. In order to reach such a conclusion, this methodology has been applied to different sample matrices and mass analyzers, taking profit of the advantages of coupling liquid chromatography to mass spectrometry.

Despite the fact that these conclusions are described in detail in their corresponding chapter of this document, the **specific conclusions** are included as follows:

1. The implementation of focused microwave extraction with two steps and at two different temperatures have permitted to quantitatively extract all the chemical forms of Cr(VI) occurring in solid samples. In addition, the use of complexing agents in basic extracting solutions have both facilitated the extraction of the Cr(III) forms by complex formation of Cr(III)-EDTA
2. It has been demonstrated that in the selected extraction conditions, Cr(III) species are stabilized. As a consequence single spike IDMS procedure using isotopically enriched Cr(VI) can be applied, reducing both analysis cost and complexity of equations. These improvements allow implementing the developed procedure to routine laboratories with the same degree of confidence that with double spike IDMS.
3. The optimized methodology for the fast and accurate determination of Cr(VI) in solid samples has been validated by LC-ICP-MS in the following certified reference materials: SRM 2700 and SRM 2701 (Hexavalent chromium in contaminated soil, low level and high level, respectively), CRM041 (sandy clay) and BCR-454 (welding dust loaded on a filter). Furthermore, interconversions between both

chromium species at different extraction conditions have been evaluated for SRM 2701, candidate SRM 2700, and CRM-041.

4. The application of isotope dilution mass spectrometry and IPD calculations has been extrapolated to the analysis of organic compounds, in order to avoid methodological calibration graphs. Due to the fact that theoretical isotopic abundances cannot directly be calculated for tandem mass spectrometry, and are necessary for IPD calculations, the software "Isopatr" have been employed.
5. The use of isotopically labeled compounds with a single ^{13}C atom have been evaluated for the determination of two alkylphenols in water samples, in order to avoid any possible isotopic effects. Given the fact that these compounds were not commercially available, they were in-house synthesized and completely characterized.
6. The evaluation of singly labeled ^{13}C compounds as internal standards by UHPLC-ESI-MS/MS has provided highly reliable results in terms of accuracy and precision. In addition, it has been possible to validate the proposed procedures at the maximum concentration levels established for alkylphenols in environmental water samples. Alternatively, a classical internal standard, n-nonylphenol, have been compared to IPD quantifications in wastewaters but without success.
7. A preconcentration step is necessary for the determination of the selected endocrine compounds (octylphenol, nonylphenol and bisphenol A) in order to reach the required sensitivity at sub-ppb levels. To do so, both conventional (solid phase extraction, SPE) and non-conventional (hollow fiber liquid phase microextraction, HF-LPME) extraction techniques have been studied. It has been observed that HF-LPME provides faster and cheaper extractions, but its implementation in routine laboratories is still complicated due to its complex manipulation as well as lack of routine material.

8. The extent of matrix effect in the mycotoxins analysis in LC-MS/MS based determinations have been evaluated by classical post-extraction addition and by monitoring the signal of a compound introduced continuously during all the chromatographic run. It has been concluded that the second approach was not able to quantitatively correct for matrix effect in the studied conditions. However, it provides an interesting vision of the qualitative matrix effect at each retention time. In general, deoxinivalenol and aflatoxin B1 have been the mycotoxins more affected by matrix effect, more specifically ion suppression
9. The comparison of five different calibration approaches to compensate for matrix effects in complex matrices (feed and spices) has shown that when no isotopically labeled internal standards are available, single-level standard addition is the most efficient approach.
10. The study focused on mycotoxins analyses has also demonstrated that the results obtained by single-point isotope dilution mass spectrometry (one point isotopic internal calibration (OPIC) and isotope pattern deconvolution (IPD)) provides quantifications with the same analytical quality (accuracy and precision) as the calibration procedures. Nevertheless, in some cases, mostly in fumonisins, unacceptable high recoveries have been obtained.

Suggestions for future works

In this Doctoral Thesis the potential of isotope dilution mass spectrometry combined with isotope pattern deconvolution calculations has been proved as a way to obtain fast and reliable quantifications. As it can be expected, the optimization of each methodology has discovered new analytical challenges. This fact resulted in a list of uncovered research due to lack of time and/or material, or for falling out of the scope of this document. The list of proposed future works is proposed below:

- Test the feasibility of Cr(VI) extractions in solid samples with conventional microwave systems in order to decrease the cost per sample analysis.
- Study the whole family of nonylphenol isomers and discover the most usual in wastewaters. When selected, the proper evaluation of its endocrine disrupting capacities will be carried out.
- Taking into account the accumulation of endocrine disrupting compounds in sewage sludge, simpler and faster analytical methodologies based on IPD must be developed.
- Carry out migration studies in packaging material for studied endocrine disrupting compounds taking profit of IPD methodology.
- Investigate the observed problems during the quantification of fumonisins in food and feed by IPD and OPIC.

Artículos científicos relacionados con la tesis

Fabregat-Cabello, N., Rodríguez-González, P., Castillo, Á., Malherbe, J., Roig-Navarro, A.F., Long, S.E., García Alonso, J.I., 2012. *Fast and Accurate Procedure for the Determination of Cr(VI) in Solid Samples by Isotope Dilution Mass Spectrometry*. Environmental Science & Technology, 46: 12542–12549.

Fabregat-Cabello, N., Castillo, Á., Sancho, J. V., González, F. V., Roig-Navarro, A.F., 2013. *Fast methodology for the reliable determination of nonylphenol in water samples by minimal labeling isotope dilution mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1301: 19–26.

Fabregat-Cabello, N., Sancho, J. V., Vidal, A., González, F. V., Roig-Navarro, A.F., 2014. *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*. Journal of Chromatography A, 1328: 43–51.

Fabregat-Cabello N., Zomer, P., Sancho, J. V., Roig-Navarro, A. F., Mol, H. G. J. 2015. *Comparison of approaches to deal with matrix effects in LC-MS/MS based determinations of mycotoxins in food and feed*. Aceptado en World of Mycotoxin Journal.

Fabregat-Cabello, N., Pitarch-Motellón, J., Sancho, J.V., Ibáñez, M., Roig-Navarro, A. F. *Comparison of solid phase extraction and hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of endocrine disrupting compounds by mass spectrometry and isotope pattern deconvolution*. Enviado a Journal of Chromatography A.

Otros artículos relacionados

Castillo, Á., Boix, C., Fabregat, N., Roig-Navarro, A.F. and Rodríguez-Castrillón, J. A., 2012. *Rapid screening of arsenic species in urine from exposed human by inductively coupled plasma mass spectrometry with germanium as internal standard*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 27: 354–358.

Agradecimientos

En primer lugar quisiera dar las gracias al Dr. Antoni Francesc Roig i Navarro y al Dr. Juan Vicente Sancho Llopis por llevar a cabo la dirección de esta tesis y por los conocimientos que he recibido durante todos estos años. *Moltíssimes gràcies per la vostra paciència, ajuda i dedicació.*

También quiero aprovechar la ocasión para agradecer al Dr. Félix Hernández Hernández su apoyo como Director del Instituto Universitario de Plaguicidas y Aguas (IUPA). Asimismo, quisiera dar las gracias a todos los miembros del grupo que me han acompañado durante mi formación, tanto a profesores como a estudiantes, por la gran ayuda y apoyo que me han brindado durante todo este tiempo. En especial quisiera dar las gracias al Dr. Ángel Castillo por su gran ayuda durante mis comienzos.

Quisiera dar también las gracias a los doctores J. Ignacio García Alonso y Pablo Rodríguez González por su esmero en transmitirme todos los conocimientos posibles durante mi año en la Universidad de Oviedo. En especial, quisiera agradecer a Pablo su ayuda esencial durante el transcurso de toda esta tesis. También quiero dar las gracias a Aida, Óscar, Sergio, Laura, Lourdes y Mario por su ayuda y amistad, pero sobre todo a Ana González por el hecho de estar siempre dispuesta a darme sabios consejos.

Por otra parte, quiero agradecer al Dr. Florenci V. González Adelantado el hecho de acogerme y enseñarme en su grupo de síntesis orgánica junto a Andreu Vidal.

I would like to take this opportunity to thank Dr. Hans Mol and Paul Zommer for their patience and cooperation during my research stay in the Netherlands. Also, I want to thank the members from RIKILT for offering their help and friendship since the very first day, most particularly to Arie, Eduardo, Patricia Plaza, Valentina, Carla, Erika and Patricia López.

El periodo predoctoral se caracteriza por ser una etapa dura, de altibajos, en la que nuestros amigos y familia son una pieza fundamental para poder seguir adelante. Por ello quisiera agradecer de todo corazón el apoyo continuo e incondicional de mis amigos, en especial a Ana Marzo y Carlos Segarra, así como a Ana María Botero y Carlos Sales. Del mismo modo quisiera agradecer a Emma, Arianna, Alejandro y Érica su constante apoyo. Por último, también quiero dar las gracias a Adi, Dinu, Patri, Markel y Elvira por ayudarme a desconectar cuando más lo he necesitado.

No puedo dejar de agradecer a Víctor su ayuda y apoyo durante el complicado proyecto de llevar a cabo una tesis, día tras día, así como con la elaboración de la portada. Del mismo modo, quisiera agradecer a mi hermano Roger su ayuda con el diseño de la imagen que tanto me gusta de los “pececitos”.

Finalmente, quisiera dar las gracias a mis padres por haber apostado y luchado tanto por mí. Porque ellos son los pilares básicos de mi vida, todo lo que he conseguido académicamente y como persona se lo debo a ellos. Nunca hubiera podido llegar hasta aquí sin su constante apoyo y sacrificios.

Muchísimas gracias a todos.