



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

**Departamento de Química Analítica  
Kimika Analitiko Saila**

Development of new applications of inductively  
coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)  
hyphenated with different sample introduction  
systems

---

Memoria presentada para optar al Grado de Doctora con  
mención "Doctor Europeus"

Ana Ugarte Baztan

2011







Esta Tesis ha sido realizada, y consecuentemente será defendida, con el propósito de obtener el título de Doctorado Europeo por la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.

Previamente a la defensa de la Tesis Doctoral, este trabajo ha sido evaluado por dos expertos pertenecientes a Instituciones de Educación Superior o Institutos de Investigación de la Unión Europea directamente relacionados con el área de investigación:

- **Dr. Olivier F.X. Donard**, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Pau (Francia).
- **Dra. Carmen C. García Perez**, Institute for Transuranium Elements, European Commission, Joint Research Centre, Eggenstein-Leopoldshafen (Alemania).



A mi familia

Etxekoei





## AGRADECIMIENTOS/ ESKER ONAK

Parece mentira que no sepa cómo empezar... La única parte de la tesis que todo el mundo se lee y así... En fin, vaya por delante que me alegra enormemente tener la oportunidad de daros las gracias, a vosotros (y vosotras...) que de maneras tan diferentes habéis hecho que esta etapa de mi vida haya sido enriquecedora tanto profesional como personalmente. Gracias por hacer que, después de todo, el balance sea sin duda más que positivo. A ver si no me dejo a nadie...

En primer lugar, quisiera dar las gracias a Ramón Barrio y Arantxa Goicolea por haberme acogido en su grupo de investigación, poniendo a mi disposición los medios necesarios para la consecución de este trabajo. A Ramón, que además de jefe ha sido junto con Nora Unceta director de este trabajo, gracias asimismo por la dedicación y los ánimos en ciertos momentos. A Nora, un enorme gracias también por todo el tiempo dedicado a esto, las meticulosas correcciones y tu buena disposición. Benetan, eskerrik asko! Arantxa, gracias igualmente por todas las molestias que te has tomado con este trabajo.

Mi agradecimiento al Vicerrectorado de Investigación de la UPV/EHU por la beca de investigación predoctoral que he disfrutado, así como al Departamento de Química Analítica. Me gustaría de igual forma reconocer la ayuda de movilidad del Ministerio de Educación con la que pude contar en la estancia en Pau. Además, doy las gracias al Servicio Central de Análisis de Álava (SGIker) por poner a mi disposición el equipamiento necesario para la realización de este trabajo.

Por supuesto, al resto de personas del grupo que han compartido conmigo horas de trabajo, cafés, comidas, discusiones, agobios, risas..., en gran medida responsables del buen recuerdo que me queda de estos años. Con compañeros así, ha dado gusto! Algunos ya no están por aquí, como Silvi (aunque nos has mandado a tu doble, y eso es casi como estar contigo...), el compañerismo personificado, muy buena persona y amiga. Era verdad: ¡todo llega, maja! O Urtzi, y nuestras charletas sobre la vida, el futuro... Eskerrik asko, emailaren beste aldean ere laguntzeko prest egoteagatik! Otros han estado por aquí siempre: Mamen, con quien he compartido

conversaciones analíticas varias y me ha enseñado tantas cosas! O Alber, con sus bromas, sus afirmaciones categóricas (como te gusta ser tan políticamente incorrecto, eh?) y las consiguientes discusiones... En el fondo, nos entretienes siempre! Con alguna desaparición de por medio, Ali, con quien en suma he compartido unos cuantos años de trabajo y muchas cosas más... Difícil escribir sin empezar a ver borroso... ¡Eskerrik asko por los consejos, los ánimos y la amistad!

De entre las que han llegado después, Zuri se merece un especial “gracias” por la colaboración con este trabajo. ¡Es sorprendente lo dispuesta que estás siempre a ayudar! También María, con su vitalidad y ánimos, y el resto de mis “nuevas vecinas”: Itsaso, Deiene, Raquel, Ana... También a las “nuevas de dentro”: Maitane y Sandra, que en los últimos meses me han preguntado “¿qué tal lo llevas?” en más de una ocasión. También “dentro”, gracias a Javi por ayudarme siempre que se lo he pedido, bien fuera soltándome un capilar, haciendo un dibujo, o acompañándome a la estación de gases.

Al profesor Nacho García Alonso de la Universidad de Oviedo y las personas de su grupo de investigación, así como al grupo del profesor Alfredo Sanz Medel, por haberme dado la oportunidad de aprender sobre ICP-MS durante los días de aquella corta estancia. También por la ayuda posterior con alguna que otra consulta.

I would also want to thank Prof. Olivier Donard, who accepted me for three months in his research group in Pau, at the *Laboratoire de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement*. Most especially thanks to Christophe Pécheyran for making my stay in Pau productive, for his efficiency and great help with laser ablation! Merci beaucoup pour les conseils et pour avoir accepté d'être membre du tribunal de ma thèse! (Et désolé pour mon français...)

En Pau me sentí muy “agustico” gracias a las “bolboretas” que conocí: Patí, Vane, Georgia y Lidi, muchas gracias por todo! Un placer que la casualidad de la vida cruzara nuestros caminos!

El apoyo, amistad y cariño de fuera de los laboratorios es igualmente de agradecer. Mil gracias a mis amig@s. A las de Puente (Ananda, Azkona, Ei, Cris, Ainara, Irene y el resto...) que, aunque sin tener nada claro qué he estado haciendo (y menos mal,

porque lo contrario sería preocupante...), siempre me habéis transmitido vuestra confianza en mí; por todos esos capítulos de “La vida sin glamour” que hemos escrito juntas, y por los que nos quedan por escribir! Eskerrik asko berezi bat Azkonikirentzat, lan honen portada eta beste hainbat kontutxo arreta handiz egiteagatik! Oso ongi geratu da, artista! También a los “paseantes”: Izare, Julen, Jabi, ..., por toda la “sabiduría” que compartimos domingo a domingo...! En Gasteiz, a la familia de Zumakera 13 (Zuri, Aran, Edu y Mery), por vuestra amistad y todos los raticos compartidos! También a la KP (zuri batez ere, Iñi, zure etxean behar izan dudanerako tarte bat egiteagatik), y a la gente de clase que veo de vez en cuando (Leire Losada, Joseba, Amaia Arizti,...) por animarme. Baita Oierri ere, beste gauzen artean ikerketa mundu honi buruz elkarbanatu ditugun elkarrizketa guzti horiengatik! Kasualidadea gero ia batera amaitzea tesia... Azken hilabeteetan nirekin hamaika bidai eta elkarrizketa partekatu dituen Amaia Munarrizi ere mila mila esker, zure laguntza eta interesa benetan eskertzekoak dira! Hurrengo zu... Animo!

Y por último, a los de casa. A mis padres, por respetar siempre mis decisiones, confiar en mí, y haberme dado todo: cariño, apoyo, educación, genes, dinero... Incluso una hermana! Que además es amiga... Lei, eskerrik asko beti hor egoteagatik (baita jenio txarra dudanean ere), laguntzeko prest! Euskarri garrantzitsua zara. Ea hau ospatzeko behintzat behar bezalako juerga bat egiten dugun...! Eta jakina, beste mila gauzen artean nire sukaldari kuttunena den Iñigori (y a tus padres, que también cocinan muy bien!), beti babesa emateagatik, une txarretan ere irribarrea lapurtzen jakiteagatik eta nire lorpen “zientifikoengatik” nirekin batera salto egiteagatik! Atsegina da oso zurekin batera bidea egitea...

A tod@s vosotr@s y a todas las personas anónimas que siendo agradables, con una sonrisa o buenas formas han hecho este trabajo más fácil Y/o gratificante,

**MIL GRACIAS!**

**MILA ESKER!**

Ana.



*Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre*  
*Marja Sklodowska (Marie Curie)*

*Zein garrantzizkoa den garrantzirik ez duena*  
*Bernardo Atxaga*

*Lo urgente no deja tiempo para lo Importante*  
*Mafalda*



## Índice general

List of acronyms .....	VII
Summary .....	XIII

### Capítulo I: Introducción

---

1.1. Introducción general.....	3
1.2. Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) .....	4
1.2.1. Introducción de muestra .....	5
1.2.2. Ionización de la muestra.....	6
1.2.3. Separación de masas y detección .....	8
1.2.4. Fortalezas y debilidades del ICP-MS.....	9
1.2.5. Interferencias espectrales y no espectrales.....	10
1.2.5.1. Interferencias espectrales .....	10
1.2.5.2. Interferencias no espectrales.....	11
Bibliografía.....	13

### Chapter II: Objectives

---

2.1. Objectives .....	19
-----------------------	----

## Capítulo III: SPME/LC-ICP-MS para especiación de compuestos organoestánicos en muestras de agua

---

3.1. Introducción.....	25
3.1.1. Importancia de la especiación elemental.....	25
3.1.2. Acoplamiento de cromatografía líquida a ICP-MS.....	27
3.1.2.1. Desarrollo histórico del acoplamiento de la cromatografía líquida con detectores elementales.....	27
3.1.2.2. Limitaciones en la utilización de ICP-MS como detector para LC.....	29
3.1.3. Preparación de muestra: aplicación de SPME a especiación de elementos.....	33
3.1.3.1. Microextracción en fase sólida.....	34
3.1.4. Compuestos organoestánicos.....	40
3.1.4.1. Propiedades físico-químicas de los OTCs.....	41
3.1.4.2. Toxicidad de los OTCs.....	41
3.1.4.3. Aplicaciones de los OTCs.....	43
3.1.4.4. Situación legislativa.....	44
3.1.4.5. Métodos analíticos para la determinación de OTCs.....	46
3.1.5. Características de los OTCs objeto de estudio.....	56
3.2. Planteamiento del problema.....	58
3.3. Material y equipamiento.....	59
3.3.1. Equipamiento.....	59
3.3.2. Reactivos y disolventes.....	60
3.3.3. Preparación de disoluciones patrón.....	62
3.3.4. Limpieza del material.....	62
3.4. Desarrollo de un método analítico LC-ICP-MS.....	63



---

3.4.1. Estudio de las variables cromatográficas de separación.....	63
3.4.1.1. Selección de la columna cromatográfica .....	63
3.4.1.2. Estudio de la composición de la fase móvil.....	66
3.4.1.3. Selección del flujo de la fase móvil .....	68
3.4.2. Estudio de las condiciones de operación del ICP-MS .....	69
3.4.3. Resumen de las condiciones cromatográficas de separación y detección .....	71
3.4.4. Estudio preliminar de reproducibilidad .....	73
3.5. Desarrollo de un método de microextracción en fase sólida .....	75
3.5.1. Acoplamiento de la SPME a LC-ICP-MS .....	75
3.5.2. Estudio de las variables experimentales de la SPME <i>on-line</i> con LC-ICP-MS....	77
3.5.2.1. Elección del tipo de fibra.....	78
3.5.2.2. Etapa de extracción.....	78
3.5.2.3. Etapa de desorción.....	84
3.5.3. Resumen de las condiciones experimentales de la SPME.....	85
3.5.4. Evaluación analítica del método SPME/LC-ICP-MS .....	87
3.5.4.1. Calibrado del método .....	87
3.5.4.2. Límites de detección .....	88
3.5.4.3. Límites de cuantificación.....	90
3.5.4.4. Repetitividad .....	91
3.6. Aplicación de la metodología analítica desarrollada a muestras reales.....	93
3.7. Conclusions.....	97
Bibliografía.....	99

## Capítulo IV: Desarrollo de patrones de calibración de HAp para LA-ICP-MS: Aplicación a muestras de espina de tñidos

---

4.1. Introducción.....	115
4.1.1. Ablación láser acoplada a ICP-MS para el análisis de muestras sólidas .....	116
4.1.1.1. Comparación con análisis en disolución por ICP-MS.....	116
4.1.1.2. Principios e instrumentación.....	118
4.1.1.3. Fraccionamiento elemental .....	120
4.1.1.4. Estrategias de calibración en LA-ICP-MS.....	122
4.1.1.5. Efectos del gas portador.....	124
4.1.1.6. Cifras de mérito de la técnica LA-ICP-MS.....	127
4.1.1.7. Aplicaciones.....	128
4.1.2. Aplicación de LA-ICP-MS al análisis de elementos traza en tejidos biomineralizados .....	130
4.1.2.1. Análisis de elementos traza en tejidos calcificados .....	130
4.1.2.2. Métodos analíticos por LA-ICP-MS para el estudio de elementos traza en tejidos calcificados .....	132
4.1.3. Análisis de elementos traza en espina dorsal de tñidos como potencial indicador de contaminación .....	134
4.2. Planteamiento del problema.....	140
4.3. Material y equipamiento.....	141
4.3.1. Equipamiento.....	141
4.3.2. Reactivos y disolventes.....	143
4.3.2.1. Patrones .....	143
4.3.2.2. Destilación del ácido nítrico <i>sub-boiling</i> .....	144
4.3.2.3. Reactivos.....	145

---

4.3.2.4. Materiales de Referencia Certificados .....	146
4.3.3. Muestras .....	146
4.3.4. Limpieza del material .....	147
4.4. Estudios previos sobre contenidos de elementos traza en tejido muscular y espina: análisis por ICP-MS en disolución.....	148
4.4.1. Digestión asistida por microondas.....	149
4.4.2. Parámetros de operación del ICP-MS.....	150
4.4.3. Evaluación de la digestión asistida por microondas mediante análisis por dilución isotópica .....	152
4.4.3.1. Breve introducción al análisis por dilución isotópica .....	152
4.4.3.2. Cuantificación por dilución isotópica antes y después de la digestión ...	158
4.4.4. Corrección de interferencias: Evaluación del empleo de ecuaciones matemáticas.....	163
4.4.5. Evaluación analítica del método por ICP-MS.....	166
4.4.5.1. Calibrado del método .....	166
4.4.5.2. Límites de cuantificación.....	167
4.4.5.3. Exactitud.....	168
4.4.5.4. Precisión .....	169
4.4.6. Evaluación de los contenidos metálicos en las muestras reales .....	170
4.4.6.1. Discusión y análisis de los resultados .....	172
4.5. Desarrollo de una metodología por LA-ICP-MS para la cuantificación <i>matrix- matching</i> de elementos traza en la espina dorsal de túnidos.....	182
4.5.1. Preparación de las espinas dorsales para su análisis por LA-ICP-MS .....	182
4.5.2. Parámetros LA-ICP-MS .....	183
4.5.3. Preparación de los patrones de calibración de HAp enriquecidos.....	189
4.5.3.1. Selección de la ruta de síntesis del HAp .....	189

---

4.5.3.2. Estudio preliminar de recuperaciones de los analitos .....	192
4.5.3.2. Preparación de los patrones de calibración de HAp enriquecidos .....	193
4.5.3.3. Homogeneidad de los <i>pellets</i> de HAp .....	196
4.5.4. Evaluación analítica del método LA-ICP-MS.....	197
4.5.4.1. Calibrado del método .....	197
4.5.4.2. Límites de detección .....	199
4.5.4.3. Exactitud y precisión .....	200
4.5.4.4. Comparación de la calibración <i>matrix-matched</i> con la <i>non matrix-matched</i> .....	201
4.5.5. Aplicación de la metodología analítica desarrollada a muestras reales .....	204
4.6. Conclusions.....	209
Bibliografía.....	211

## Contribuciones de la Tesis

---

Contribuciones de la Tesis .....	229
----------------------------------	-----

---

## LIST OF ACRONYMS

---

AAS	Atomic Absorption Spectrometry
AED	Atomic Emission Detection
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ARN	Ribonucleic Acid
ASE	Accelerated Solvent Extraction
BCR	Community Bureau of Reference (European Commission)
CAR	Carboxen
CAS	Chemical Abstracts Service registration number of the American Chemical Society
CE	Capillary Electrophoresis
CRM	Certified Reference Material
CT	Cryogenic Trap
CW/TPR	Carbowax/Templated Resin
DBT	Dibutyltin Dichloride
DET	Diethyltin Dichloride
DI	Internal Diameter
DIHEN	Direct Injection High Efficiency Nebulizer
DIN	Direct Injection Nebulizer
DLME	Dispersive Liquid Microextraction
DMT	Dimethyltin Dichloride
DOcT	Diocetyl tin Dichloride
DPhT	Diphenyltin Dichloride
EPA	United States Environmental Protection Agency
ES/ITMS	Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry
ESI	Electrospray Ionization
ESI-MS	Electrospray Ionization/ Mass Spectrometry
ETAAS	Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
ETV	Electrothermal Vaporization

FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry
FAO	Food and Agriculture Organization
FBTO	Fenbutatin Oxide
FFF	Field Flow Fractionation
FID	Flame Ionization Detector
FPD	Flame Photometric Detector
FT-ICR	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance
GBR	Great Barrier Reef (Australia)
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography- Mass Spectrometry
HAp	Hydroxyapatite
HEN	High Efficiency Nebulizer
HG	Hydride Generation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR-ICP-MS	High Resolution ICP-MS
HS	Headspace
IC	Confidence Interval
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma- Optical Emission Spectrometry
ICP-QMS	Quadrupole ICP-MS
ICP-SFMS	Inductively Coupled Plasma- Sector Field Mass Spectrometry
ICP-TOFMS	Inductively Coupled Plasma Time- of- Flight Mass Spectrometry
ID	Isotope Dilution
IS	Internal Standard
IMO	International Maritime Organization
IR	Infrared
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LA	Laser Ablation
LC	Liquid Chromatography
LLE	Liquid- Liquid Extraction
LOD	Limit of Detection

---

LOQ	Limit of Quantification
MBT	Monobutyltin Trichloride
MCGC	Multicapillary Gas Chromatography
MC-ICP-MS	Multicollector ICP-MS
MEPC	Marine Environment Protection Committee
MET	Monoethyltin trichloride
MIP	Microwave Induced Plasma
MIP-AED(AES)	Microwave Induced Plasma- Atomic Emission Detector/ Spectrometry
MISPE	Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction
MMT	Monomethyltin Trichloride
MOcT	Monooctyltin Trichloride
MPhT	Monophenyltin Trichloride
MS	Mass Spectrometry
NIES	National Institute for Environmental Studies (Japan)
NIST	National Institute of Standards and Technology (United States)
NMIJ	National Metrology Institute of Japan
NRCC	National Research Council Canada
OPO	Optical Parametric Oscillator
ORS	Octopole Reaction System
OSF	Octanosulphonic Acid
OTC	Organotin Compound
PA	Polyacrylate
PDMS	Polydimethylsiloxane
PDMS/DVB	Polydimethylsiloxane/ Divinylbenzene
PEEK	Polyether Ether Ketone
PEG	Polyethylene Glycol
PFA	Perfluoroalkoxy
PFPD	Pulsed Flame Photometric Detector
PLE	Pressurized Liquid Extraction
PTFE	Polytetrafluoroethylene

PVC	Poly (Vinyl Chloride)
PVDF	Polyvinylidene fluoride
QSIL	Quartz Surface Induced Tin Emission
RM	Reference Material
RP	Reverse Phase
RSD	Relative Standard Deviation
RTL	Retention Time Locked
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SD	Standard Deviation
SDME	Single Drop Microextraction
SLE	Solid-Liquid Extraction
SLM	Supported Liquid Membrane
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Microextraction
SRM	Standard Reference Material
SS-ID	Species-Specific Isotope Dilution
TBT	Tributyltin Chloride
TCyT	Tricyclohexyltin Chloride
TEA	Triethylamine
TET	Triethyltin Chloride
TMACl	Tetramethylammonium chloride
TMT	Trimethyltin Chloride
TOcT	Trioctyltin Chloride
TPhT	Triphenyltin
TPrT	Tripropyltin Chloride
TrBT	Tetrabutyltin
TrET	Tetraethyltin
TrMT	Tetramethyltin
TrPhT	Tetraphenyltin
UAE	Ultrasound-Assisted Extraction
UPE	Ultrasonic Probe Extraction



UV(-Vis)	Ultraviolet (-Visible)
XRD	X-Ray Diffraction
XRF	X-Ray Fluorescence
$\mu$ -LC	Micro Liquid Chromatography



## SUMMARY

Nowadays, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS) is one of the most powerful and versatile techniques for trace element analysis thanks to its robustness and low detection limits.

The research work described in this memory aims to broaden the application range of this technique, developing new applications based on the hyphenation of ICP-MS with different sample introduction techniques.

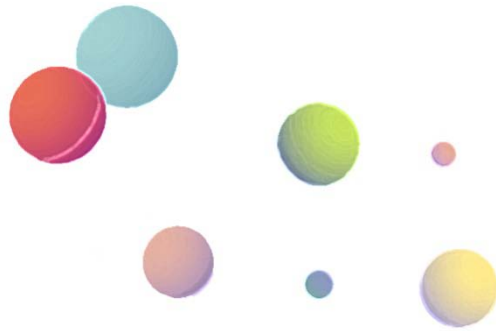
In the first stage of this work, the hyphenation of liquid chromatography and ICP-MS with solid phase microextraction (SPME) for speciation is presented. This new instrumental combination has been applied for the determination of organotin compounds (OTCs) in freshwater and seawater samples. Even though the coupling between LC and ICP-MS is straightforward, some problems may arise from the composition of the mobile phase, aspects that have been studied in this work. As for the coupling of SPME on-line to LC-ICP-MS, a hyphenation that to date has never been proposed, different considerations have been taken into account. The optimization of the SPME/LC-ICP-MS method for the extraction, separation and quantification of organotin compounds has been discussed and the validation parameters (linearity, detection and quantification limits and repeatability) are presented.

In the second part, an environmental application of laser ablation coupled to ICP-MS is presented. This technique allows direct solid sampling but suffers from “elemental fractionation”, a matrix-dependent phenomenon described as the main limitation for quantitative analysis without matrix-matched calibration standards. In the environmental field LA-ICP-MS has been broadly used to analyze trace elements in biominerals, with calcium carbonate matrices being the most widely assessed. In the present study, however, the development of hydroxyapatite (HAp) standards for quantitative multi-element LA-ICP-MS has been done. A series of HAp standards have

been synthesized by co-precipitation of the analytes from calcium nitrate tetrahydrate and ammonium dihydrogen phosphate. The analyte concentrations in the obtained HAp standards, their homogeneity and the linearity obtained with them have been carefully assessed and their applicability evaluated in tuna fish first dorsal spines. These structures are interesting because they present growth rings, and therefore, could potentially be used as indicators of environmental pollution. Furthermore, correlations between trace element contents in this structure and in muscle of tuna have been assessed by solution-based ICP-MS after microwave acid digestion.

# 1. Introducción

---





## 1.1. Introducción general

Desde que G. Kirchoff y R. Bunsen idearon, en 1859, el primer espectroscopio y descubrieron que las líneas espectrales son únicas de cada elemento, los desarrollos teóricos y experimentales que se han dado en el campo de la espectroscopia atómica han sido muchos. Entre ellos destaca el desarrollo en 1955 por parte de A. Walsh de la espectroscopia de absorción atómica (AAS), que ha sido descrito como "uno de los avances más significativos del análisis químico" del siglo XX. Unos años más tarde, en 1963, S. Greenfield y colaboradores desarrollaron el plasma de acoplamiento inductivo (ICP) anular, el cual ha tenido un impacto enorme en el desarrollo del análisis instrumental. Así, el ICP se aplicó en primer lugar a la espectrometría de emisión óptica (ICP-OES) como fuente de excitación espectroquímica, y posteriormente en conjunción con espectrometría de masas como fuente de ionización (ICP-MS).

Al tiempo que se daban estos avances instrumentales, principalmente en la segunda mitad del siglo XX, aumentaba la sensibilización por los temas relacionados con el medio ambiente y, entre ellos, la preocupación por los efectos adversos de los metales pesados. Además, se iba haciendo patente la relevancia de la determinación de elementos traza en matrices ambientales y biológicas, dada su influencia en los ecosistemas y en las funciones vitales de los organismos. De este modo, surgía la necesidad de determinar muy bajas concentraciones de elementos en diversas matrices.

En consecuencia, tras la llegada del primer ICP-MS comercial en 1983, éste fue ganando aceptación gracias, principalmente, a sus bajos límites de detección.

## 1.2. Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

La espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS) fue introducida como técnica analítica en 1980 por Houk y colaboradores<sup>1</sup>. A pesar de que el diseño básico no ha variado en exceso desde entonces, las importantes mejoras en términos de límites de detección, rango dinámico lineal del detector y robustez han hecho del ICP-MS una de las técnicas clave para el análisis de trazas y ultra-trazas de elementos en disolución<sup>2, 3</sup>. Hoy en día esta técnica permite llevar a cabo análisis multielementales en un amplio rango dinámico lineal con muy bajos límites de detección, permitiendo además realizar medidas de relaciones isotópicas<sup>4</sup>. Así, los límites de detección para los ICP-MS cuadrupolares se encuentran en el rango de los  $\text{pg g}^{-1}$  o inferiores para la mayoría de los elementos (Figura 1.1).



Figura 1.1. Elementos tradicionalmente determinados por ICP-MS cuadrupolar junto con sus límites de detección aproximados<sup>5</sup>.



En las medidas por ICP-MS se dan tres etapas fundamentales a considerar. La primera es la introducción de la muestra. En una segunda etapa, los analitos son transportados al plasma, donde son vaporizados e ionizados. En la última etapa, los iones son separados en función de su relación masa/carga en diferentes tipos de analizadores de masa (cuadrupolo, sector magnético o tiempo de vuelo), para finalmente alcanzar el detector (multiplicador de electrones o copa de Faraday). En la Figura 1.2 se muestra un diagrama de un ICP-MS cuadrupolar.

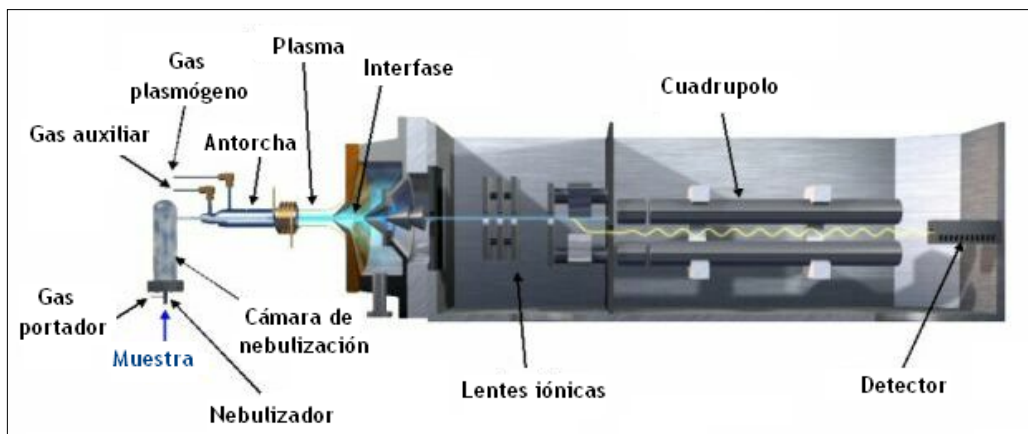


Figura 1.2. Diagrama de un ICP-MS cuadrupolar<sup>6</sup>.

### 1.2.1. Introducción de muestra

El sistema de introducción de muestra se considera “el talón de Aquiles” del ICP-MS. La muestra debe de convertirse estequiométricamente en un aerosol para ser introducida en el plasma, ya que una deriva en la composición elemental supondría errores en los resultados analíticos. El ICP-MS permite la introducción continua de muestras líquidas, sólidas o gaseosas.

Para el análisis en disolución existen diferentes sistemas de introducción de muestra. La técnica convencional consiste en la generación de un aerosol mediante un nebulizador neumático y la selección de las gotas a través de una cámara de nebulización de la que existen diferentes diseños<sup>6, 7</sup>. La baja eficiencia (sólo el 1-2 % de la muestra aspirada alcanza el plasma) y el alto consumo de muestra (de 1-2 mL min<sup>-1</sup>) son las principales

limitaciones de esta técnica<sup>8, 9</sup>. Por ello, se desarrollaron nebulizadores de alta eficiencia que consumen sólo entre 50 y 200  $\mu\text{L min}^{-1}$  de disolución<sup>10-15</sup>. El bajo consumo de muestra es una ventaja cuando el volumen de la misma es limitado o cuando el ICP-MS se acopla a técnicas cromatográficas<sup>10</sup>.

Una alternativa para mejorar el rendimiento de la nebulización fue el desarrollo de nebulizadores de inyección directa (*Direct Injection Nebulizers, DIN*), en los que la muestra es directamente nebulizada en el plasma<sup>16-18</sup>. Sin embargo, el mayor volumen de muestra introducido (en comparación con la nebulización convencional) causa un aumento del efecto de matriz. La combinación de la inyección directa con nebulizadores de alta eficiencia (*Direct Injection High Efficiency Nebulizers, DIHEN*) reduce el efecto de matriz<sup>19</sup>, pero resulta más caro que los sistemas tradicionales de introducción de muestra.

Otras técnicas para la introducción de muestras líquidas son los nebulizadores ultrasónicos con alto<sup>20</sup> y bajo<sup>21</sup> consumo de muestra, los inyectores de micropartículas secas y monodispersas<sup>22, 23</sup>, o el sistema de introducción de muestra integrado en la antorcha (*torch integrated sample introduction system, TISIS*)<sup>24</sup>. Tanto disoluciones como suspensiones pueden introducirse también mediante vaporización electrotérmica<sup>25-28</sup>.

El análisis de muestras sólidas con ICP-MS puede llevarse a cabo mediante ablación láser<sup>29, 30</sup> o *spark ablation*, restringida esta última a muestras conductoras<sup>29, 31</sup>.

En cuanto a la introducción continua de muestras gaseosas al ICP-MS, se realiza bien acoplando Cromatografía de Gases<sup>32</sup> o por generación de hidruros<sup>33, 34</sup>.

### 1.2.2. Ionización de la muestra

Para la vaporización, atomización e ionización del aerosol, se utiliza un plasma de argón acoplado inductivamente (ICP). En su configuración original, el ICP se utilizó como una fuente de excitación para espectrometría de emisión óptica<sup>35</sup>, pero puede ser

igualmente acoplado a un espectrómetro de masas <sup>1</sup>. Las antorchas de ICP utilizadas en los instrumentos de hoy en día son muy similares a la de tipo Scott-Fassel introducida en 1974<sup>36, 37</sup> (Figura 1.3). Un plasma ICP típico a presión atmosférica se forma cuando un gas inerte, generalmente Ar, es introducido en una antorcha de cuarzo (que consiste en tres tubos concéntricos de diámetros variables), rodeada de una bobina de inducción conectada a un generador de radiofrecuencias. Por el canal central de dicha antorcha se arrastra el aerosol de la muestra mediante el gas nebulizador Ar a un flujo de entre 0.9 y 1.5 L min<sup>-1</sup>. Por el canal más externo de la antorcha circula, a una velocidad de flujo de 15 L min<sup>-1</sup> y de forma tangencial, el “gas plasmógeno”, es decir, el argón que forma el plasma y refrigera la antorcha, ya que previene el contacto físico entre el plasma y las paredes externas de la antorcha, evitando que éstas se fundan. El tubo intermedio de la antorcha lleva un flujo de Ar (1 L min<sup>-1</sup>) que centra el plasma y se conoce como “gas auxiliar”, utilizado también para refrigerar ya que mantiene el plasma formado lejos de la boca de la antorcha (Figura 1.3).

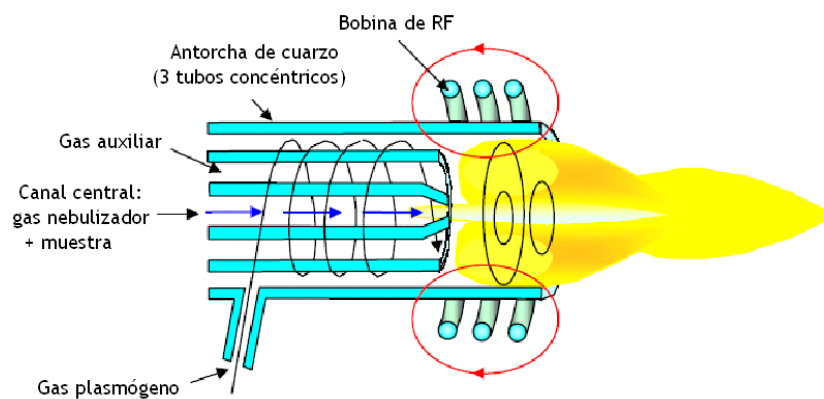


Figura 1.3. Antorcha de ICP.

El plasma es calentado aplicando una radio frecuencia (600- 1500 W, 27.12 MHz o 40.68 MHz) en la bobina que rodea la antorcha. La ignición se inicia mediante una descarga y alcanza temperaturas entre 5000 y 7000 K<sup>38, 39</sup>. El argón como plasma resulta muy adecuado porque su primer potencial de ionización es relativamente alto (15.8 eV). Esto permite la ionización de la mayoría de los elementos, de los cuales 50 lo hacen por encima de un 90%<sup>40</sup>. El He, el F y el Ne tienen su primer potencial de ionización

superior al del Ar, y por lo tanto no son ionizables en el plasma. Sin embargo, existen elementos que a pesar de que tienen el primer potencial de ionización inferior al del Ar, éste es alto, por lo que son difíciles de ionizar (como el N, el O, el Cl, el Br). La mayoría de los elementos tienen el segundo potencial de ionización cerca o por encima de los 15.8 eV del Ar, por lo que los iones doblemente cargados son raros. Con todo, la formación de especies doble cargadas y óxidos se ve influenciada principalmente por la potencia reflejada del plasma, los flujos de gas y la posición en profundidad de la antorcha (*sampling depth*) y ha de minimizarse.

### 1.2.3. Separación de masas y detección

Los iones generados en el ICP a presión atmosférica pasan a través de la interfase al analizador de masas. En un primer paso, los iones son guiados a través del cono de muestreo *-sampler-* (con un orificio de 1 mm), y después por el cono de separación o *-skimmer-* (orificio de ~0.8-0.4 mm). Entre ambos conos, y por medio de una bomba rotatoria, se obtiene un vacío de entorno a 10 Pa. Este paso desde presión atmosférica a una zona de menor presión provoca una expansión adiabática que preserva la composición iónica del plasma<sup>41</sup>. En la región del analizador, se consigue un vacío inferior a 0.1 Pa mediante bombas turbomoleculares.

Hoy en día se emplean varios analizadores de masas en combinación con la fuente de iones ICP. Los de cuadrupolo<sup>1, 42</sup>, tiempo de vuelo<sup>43-45</sup> y de sector magnético<sup>46</sup> están disponibles comercialmente. Sin embargo, el ICP también ha sido acoplado a espectrometría de masas con analizador de trampa iónica (ITMS)<sup>47, 48</sup> y a espectrometría de masas con resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier (FT-ICR)/MS<sup>49</sup>.

Uno de los analizadores de masas más empleado en la actualidad es el cuadrupolo. Los sistemas basados en un cuadrupolo representan en la actualidad aproximadamente el 95% del mercado<sup>4</sup>. Un filtro cuadrupolar está formado por cuatro barras cilíndricas y metálicas colocadas en las esquinas de un cuadrado, entre las que se aplica cierta

combinación de potenciales constantes y alternos que llevan a la estabilización y consiguiente selección (secuencial) de una relación masa/carga bien definida. La resolución de masa ( $m/\Delta m \sim 300$ ) es insuficiente para resolver interferencias moleculares que ocurren en ciertas masas. Sin embargo, los iones moleculares pueden ser parcialmente eliminados en una celda de reacción/colisión, donde interactúa con un gas<sup>50</sup>. Los iones con la relación masa/carga deseada alcanzan, después de la separación de masas, el detector, que habitualmente es un multiplicador de electrones secundarios. El resto de iones son desviados hacia las barras del cuadrupolo. Con esta disposición, en modo de conteo por pulsos, pueden detectarse hasta dos millones de cuentas por segundo, mientras que en modo analógico el detector amplía el rango dinámico lineal hasta más de nueve órdenes de magnitud. Esto permite la determinación de metales mayoritarios, minoritarios, trazas y ultra-trazas en un único análisis, haciendo que la técnica sea útil también para el análisis de muestras sólidas.

#### 1.2.4. Fortalezas y debilidades del ICP-MS

En la Tabla 1.1 se muestran las principales fortalezas y debilidades del ICP-MS frente a otros analizadores elementales.

Tabla 1.1. Fortalezas y debilidades del ICP-MS frente a otros analizadores elementales.

<b>Fortalezas</b>	<p>Límites de detección muy bajos (LOD <math>\sim</math> ng L<sup>-1</sup>)</p> <p>Elevada capacidad de procesamiento de muestras</p> <p>Espectros sencillos</p> <p>Sistemas alternativos de introducción de muestras como ablación láser (LA) o la vaporización electrotérmica (ETV), además de la posibilidad de acoplamiento con otras técnicas como LC (cromatografía líquida) o GC (cromatografía de gases)</p> <p>Técnica multielemental. Posibilidad de medir varios elementos durante la misma medición en un amplio rango de masas entre 6 (Li) y 238 (U)</p> <p>Posibilidad de obtener información isotópica</p> <p>Amplio rango lineal (más de nueve órdenes de magnitud)</p>
<b>Debilidades</b>	<p>Interferencias espectrales y no espectrales</p> <p>Altos costes de adquisición y mantenimiento (elevados caudales de Ar)</p>

### 1.2.5. Interferencias espectrales y no espectrales

Los análisis en ICP-MS se hallan limitados por la existencia de interferencias espectrales y no espectrales. Se considera interferencia cualquier efecto que cambia la señal mientras la concentración de analito se mantiene constante.

#### 1.2.5.1. Interferencias espectrales

Ocurren cuando uno de los isótopos medidos sufre una interferencia debido a un ión que tiene la misma relación masa/carga. Si la interferencia se debe a un conjunto de átomos se conoce como interferencia poliatómica, generalmente asociada a átomos de Ar de los gases del ICP, a la matriz de la muestra y al disolvente, a otros analitos, o a la entrada de oxígeno o nitrógeno del aire circundante. Cuando la interferencia se debe a un isótopo de otro elemento con igual relación masa/carga se habla de interferencia isobárica (Ej.  $^{114}\text{Sn}$  y  $^{114}\text{Cd}$ ).

Las interferencias espectrales pueden ser evitadas eliminando la matriz o empleando técnicas cromatográficas para su separación. También es posible resolverlas empleando correcciones matemáticas o celdas de colisión/reacción. La obtención de resultados analíticos exactos requiere que estas interferencias espectrales sean identificadas y eliminadas o en su defecto corregidas.

#### 1.2.5.2. Interferencias no espectrales

En ICP-MS, las interferencias no espectrales son aquellos cambios en la intensidad de la señal analítica (una supresión o un incremento) que no pueden ser considerados como un solapamiento reconocible. Son causadas por el impacto que tiene la matriz en todos los procesos que ocurren desde la aspiración de la muestra hasta la detección de los iones, por lo que también se conocen como efectos de matriz. En el caso de matrices orgánicas, este tipo de interferencias son causadas por diferencias entre las propiedades (viscosidad, tensión superficial, densidad, velocidad de evaporación y presión de vapor) de la muestra y los disolventes aspirados<sup>51</sup>.

Los efectos de matriz pueden ser compensados mediante el “*matrix-matching*”, que consiste en añadir al blanco y a los patrones una concentración conocida de todos los elementos presentes en la matriz. El más claro ejemplo de “*matrix-matching*” es el método de las adiciones estándar. Otra posible alternativa para minimizar este tipo de interferencias es la dilución de la muestra, aunque ello conlleva una pérdida de sensibilidad.

Sin embargo, el método clásico para compensar las interferencias no espectrales es la utilización del patrón interno, que consiste en la adición de uno o más elementos a muestras, patrones de calibración y blancos, con el fin de corregir cualquier variación causada por la matriz en la respuesta de los elementos.

Hoy en día existen accesorios que permiten la introducción de muestras con matrices complejas minimizando las interferencias no-espectrales, permitiendo así el análisis directo de muestras con hasta un 1% de sólidos disueltos totales sin necesidad de dilución. Es el caso del accesorio para introducción de matrices complejas HMI (*High Matrix Introduction*) de Agilent Technologies, basado en una disminución de la eficiencia de nebulización (el porcentaje de muestra que alcanza el plasma es menor) en combinación con unas condiciones de plasma robusto.

## Bibliografía

- [1] HOUK, R.S., FASSEL, V.A., FLESCHE, G.D., SVEC, H.J., GRAY, A.L. y TAYLOR, C.E. Inductively coupled argon plasma as an ion source for mass spectrometric determination of trace elements. *Analytical Chemistry*, 1980, 52 (14), 2283-2289.
- [2] HOUK, R.S. y THOMPSON, J.J. Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 1988, 7 (4), 425-461.
- [3] DOUGLAS, D.J. y HOUK, R.S. Inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Progress in Analytical Atomic Spectroscopy*, 1985, 8 (1), 1-18.
- [4] BEAUCHEMIN, D. Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2010, 82 (12), 4786-4810.
- [5] PERKIN ELMER INSTRUMENTS. ICP Mass Spectrometry, The 30-Minute Guide to ICP-MS. USA: 2004. 006355E\_01.
- [6] AGILENT TECHNOLOGIES. ICP-MS inductively coupled mass spectrometry-A primer. USA: 2005. Número de publicación: 5989-3526EN.
- [7] THOMAS, R. A beginner's guide to ICP-MS Part II: The sample-introduction system. *Spectroscopy*, 2001, 16 (5), 56-58, 60.
- [8] MONTASER, A. y GOLIGHTLY, D.W. Inductively coupled plasmas in analytical atomic spectrometry. New York: Wiley-VCH, 1992. ISBN: 0471188115.
- [9] JARVIS, K.E., GRAY, A.L. y HOUK, R.S. Handbook of inductively coupled plasma mass spectrometry. New York: Chapman and Hall, 1992. ISBN: 0412025019.
- [10] NAM, S.H., LIM, J.S. y MONTASER, A. High-efficiency nebulizer for argon inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1994, 9 (12), 1357-1362.
- [11] LIU, H., MONTASER, A., DOLAN, S.P. y SCHWARTZ, R.S. Evaluation of a low sample consumption, high-efficiency nebulizer for elemental analysis of biological samples using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1996, 11 (4), 307-311.
- [12] LIU, H. y MONTASER, A. Phase-doppler diagnostic studies of primary and tertiary aerosols produced by a high-efficiency nebulizer. *Analytical Chemistry*, 1994, 66 (19), 3233-3242.
- [13] LIU, H., CLIFFORD, R.H., DOLAN, S.P. y MONTASER, A. Investigation of a high-efficiency nebulizer and a thimble glass frit nebulizer for elemental analysis of biological materials by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 1996, 51B (1), 27-40.
- [14] OLESIK, J.W., KINZER, J.A. y HARKLEROAD, B. Inductively coupled plasma optical emission spectrometry using nebulizers with widely different sample consumption rates. *Analytical Chemistry*, 1994, 66 (13), 2022-2030.



- [15] PERGANTIS, S.A., HEITHMAR, E.M. y HINNERS, T.A. Microscale flow injection and microbore high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry via a high-efficiency nebulizer. *Analytical Chemistry*, 1995, 67 (24), 4530-4535.
- [16] LAWRENCE, K.E., RICE, G.W. y FASSEL, V.A. Direct liquid sample introduction for flow injection analysis and liquid chromatography with inductively coupled, argon plasma spectrometric detection. *Analytical Chemistry*, 1984, 56 (2), 289-292.
- [17] LAFRENIERE, K.E., RICE, G.W. y FASSEL, V.A. Flow injection analysis with inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy: critical comparison of conventional pneumatic, ultrasonic and direct injection nebulization. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 1985, 40B (10-12), 1495-1504.
- [18] WIEDERIN, D.R., SMITH, F.G. y HOUK, R.S. Direct injection nebulization for inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1991, 63 (3), 219-225.
- [19] MCLEAN, J.A., ZHANG, H. y MONTASER, A. A direct injection high-efficiency nebulizer for inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1998, 70 (5), 1012-1020.
- [20] OLSON, K.W., HAAS, W.J., JR. y FASSEL, V.A. Multielement detection limits and sample nebulization efficiencies of an improved ultrasonic nebulizer and a conventional pneumatic nebulizer in inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1977, 49 (4), 632-637.
- [21] TARR, M.A., ZHU, G. y BROWNER, R.F. Microflow ultrasonic nebulizer for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1993, 65 (13), 1689-1695.
- [22] FRENCH, J.B., ETKIN, B. y JONG, R. Monodisperse dried microparticulate injector for analytical instrumentation. *Analytical Chemistry*, 1994, 66 (5), 685-691.
- [23] OLESIK, J.W. y HOBBS, S.E. Monodisperse dried microparticulate injector: a new tool for studying fundamental processes in inductively coupled plasmas. *Analytical Chemistry*, 1994, 66 (20), 3371-3378.
- [24] GROTTI, M., SOGGIA, F. y LUIS TODOLÌ, J. Ultratrace analysis of Antarctic snow samples by reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry using a total-consumption micro-sample- introduction system. *Analyst*, 2008, 133 (10), 1388-1394.
- [25] WENDE, M.C. y BROEKAERT, J.A. Investigations on the use of chemical modifiers for the direct determination of trace impurities in Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ceramic powders by slurry electrothermal evaporation coupled with inductively-coupled plasma mass spectrometry (ETV-ICP-MS). *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 370 (5), 513-520.
- [26] VANHAECKE, F., RESANO, M. y MOENS, L. Electrothermal vaporization ICP-mass spectrometry (ETV-ICP-MS) for the determination and speciation of trace elements in solid samples - A review of real-life applications from the author's lab. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002, 374 (2), 188-195.
- [27] ARSLAN, Z. y PAULSON, A.J. Solid phase extraction for analysis of biogenic carbonates by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry (ETV-ICP-MS): an investigation of rare earth element signatures in otolith microchemistry. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 476 (1), 1-13.

- [28] ARAMENDÍA, M., RESANO, M. y VANHAECKE, F. Electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-mass spectrometry: A versatile tool for tackling challenging samples. A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 648 (1), 23-44.
- [29] GÜNTHER, D., JACKSON, S.E. y LONGERICH, H.P. Laser ablation and arc/spark solid sample introduction into inductively coupled plasma mass spectrometers. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 1999, 54B (3-4), 381-409.
- [30] GÜNTHER, D., HORN, I. y HATTENDORF, B. Recent trends and developments in laser ablation-ICP-mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 368 (1), 4-14.
- [31] JIANG, S.J. y HOUK, R.S. Arc nebulization for elemental analysis of conducting solids by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1986, 58 (8), 1739-1743.
- [32] CHONG, N.S. y HOUK, R.S. Inductively coupled plasma-mass spectrometry for elemental analysis and isotope ratio determinations in individual organic compounds separated by gas chromatography. *Applied Spectroscopy*, 1987, 41 (1), 66-74.
- [33] DATE, A.R. y GRAY, A.L. Progress in plasma source mass spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 1983, 38B (1-2), 29-37.
- [34] POWELL, M.J., BOOMER, D.W. y MCVICARS, R.J. Introduction of gaseous hydrides into an inductively coupled plasma mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 1986, 58 (13), 2864-2867.
- [35] WENDT, R.H. y FASSEL, V.A. Induction-coupled plasma spectrometric excitation source. *Analytical Chemistry*, 1965, 37 (7), 920-922.
- [36] SCOTT, R.H., FASSEL, V.A., KNISELEY, R.N. y NIXON, D.E. Inductively coupled plasma-optical emission analytical spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1974, 46 (1), 75-80.
- [37] SCOTT, R.H. y KOKOT, M.L. Application of inductively coupled plasmas to the analysis of geochemical samples. *Analytica Chimica Acta*, 1975, 75 (2), 257-270.
- [38] HUANG, M., HANSELMAN, D.S., YANG, P. y HIEFTJE, G.M. Isocontour maps of electron temperature, electron number density and gas kinetic temperature in the argon inductively coupled plasma obtained by laser-light Thomson and Rayleigh scattering. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 1992, 47B (6), 765-785.
- [39] TANNER, S.D. Plasma temperature from ion kinetic energies and implications for the source of diatomic oxide ions in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1993, 8 (6), 891-897.
- [40] HOUK, R.S. Mass spectrometry of inductively coupled plasmas. *Analytical Chemistry*, 1986, 58 (1), 97A-98A, 100A-105A.
- [41] RUIZ ENCINAR, J. Medida de relaciones isotópicas mediante ICP-MS: aplicaciones analíticas [Tesis doctoral]. Oviedo: Universidad de Oviedo, Departamento de Química Física y Analítica, 2001.
- [42] DATE, A.R. y GRAY, A.L. Plasma source mass spectrometry using an inductively coupled plasma and a high resolution quadrupole mass filter. *Analyst*, 1981, 106 (1269), 1255-1267.

- [43] STURGEON, R.E., LAM, J.W.H. y SAINT, A. Analytical characteristics of a commercial ICP orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer (ICP-TOFMS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, 15 (6), 607-616.
- [44] MAHONEY, P.P., RAY, S.J. y HIEFTJE, G.M. Time-of-flight mass spectrometry for elemental analysis. *Applied Spectroscopy*, 1997, 51 (1), 16A-28A.
- [45] MEYERS, D.P., LI, G., MAHONEY, P.P. y HEIFTJE, G.M. An inductively coupled plasma-time-of-flight mass spectrometer for elemental analysis. Part II: Direct current quadrupole lens system for improved performance. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1995, 6 (5), 400-410.
- [46] BRADSHAW, N., HALL, E.F.H. y SANDERSON, N.E. Inductively coupled plasma as an ion source for high-resolution mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1989, 4 (8), 801-803.
- [47] KOPPENAAL, D.W., BARINAGA, C.J. y SMITH, M.R. Performance of an inductively coupled plasma source ion trap mass spectrometer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1994, 9 (9), 1053-1058.
- [48] BARINAGA, C.J. y KOPPENAAL, D.W. Ion-trap mass spectrometry with an inductively coupled plasma source. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1994, 8 (1), 71-76.
- [49] MILGRAM, K.E., WHITE, F.M., GOODNER, K.L., WATSON, C.H., KOPPENAAL, D.W., BARINAGA, C.J., SMITH, B.H., WINEFORDNER, J.D., MARSHALL, A.G., HOUK, R.S. y EYLER, J.R. High-resolution inductively coupled plasma Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1997, 69 (18), 3714-3721.
- [50] TANNER, S.D., BARANOV, V.I. y BANDURA, D.R. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 2002, 57B (9), 1361-1452.
- [51] THOMAS, R. A beginner's guide to ICP-MS part XII - a review of interferences. *Spectroscopy*, 2002, 17 (10), 24-26, 28-31.



## 2. Objectives

---





## 2.1. Objectives

As previously shown, ICP-MS is nowadays one of the most powerful techniques for the analysis and quantification of trace elements. Furthermore, as discussed below, its hyphenation to other techniques widely broadens its application areas in atomic spectroscopy.

Being this the state of the art, this work seeks to extend the application range of ICP-MS technique developing new applications of ICP-MS in combination with different sample introduction systems. On the one hand, the development of a new methodology based on LC-ICP-MS using solid phase microextraction (SPME) as sample introduction system for speciation is considered, and, secondly, a laser ablation-ICP-MS (LA-ICP-MS) method with matrix-matching calibration for trace element determination in fishbone is presented.

Thus, this work is structured around these two independent analytical methods, each of them constituting the main objectives of this study:

- **On-line coupling of solid phase microextraction (SPME) to LC-ICP-MS for the speciation of organotin compounds (tributyltin, triphenyltin, trimethyltin and tripropyltin) in water samples.**

Due to its simple, fast and solvent-less features SPME has received growing interest in speciation analysis. The coupling between SPME and LC-ICP-MS, however, has never

been previously described in the bibliography. To achieve this main objective, a series of methodological objectives should be carried out:

- ✓ Optimization of liquid chromatographic separation and subsequent detection by ICP-MS for the determination of the selected organotin species.
  - ✓ Optimization of the extraction and preconcentration of the analytes by SPME coupled to LC-ICP-MS.
  - ✓ Analytical assessment of the developed method for the quantitative determination of the organotin compounds.
  - ✓ Application of the SPME/LC-ICP-MS method to the determination of tributyltin, triphenyltin, trimethyltin and tripropyltin in freshwater and seawater samples.
- 
- **Development of matrix-matching hydroxyapatite standards for quantitative LA-ICP-MS analysis of trace elements in fishbone.**

The analysis of trace elements in biominerals is one of the main environmental applications of LA-ICP-MS, most of the studies being in calcium carbonate matrices (otoliths, corals, shells, etc). However, hydroxyapatite (HAp) matrices have been less investigated. In this context, an original procedure for the synthesis of matrix-matched HAp standards for LA-ICP-MS is proposed. The standards would be used to assess trace elements in the dorsal spine of tuna fish. For this, first it would be necessary to study the correlations of metal contents in this structure and muscle by solution based ICP-MS. As in the previous case, a series of methodological objectives should be achieved:

- ✓ Development and evaluation of a solution-based ICP-MS method for the quantification of trace elements in dorsal spine and muscle of tuna fish after microwave assisted digestion.



- ✓ Application of the ICP-MS method to the determination of the analytes in dorsal spine and muscle samples of tuna.
- ✓ Assessment of the correlation between the concentration levels of trace elements quantified in both matrices.
- ✓ Development of a co-precipitation procedure for the synthesis of HAp calibration standards for LA-ICP-MS analyses.
- ✓ Study of the homogeneity and analytical assessment of the LA-ICP-MS method.
- ✓ Determination of trace element concentration profiles in tuna fish dorsal spines by the developed matrix-matching LA-ICP-MS method.



3. SPME/LC-ICP-MS para especiación de  
compuestos organoestánicos en muestras de  
agua

---





## 3.1. Introducción

En este capítulo se detalla lo relativo al desarrollo de un método analítico para la especiación de compuestos organoestánicos (OTCs) trisustituidos en muestras de agua. El método está basado en un novedoso acoplamiento instrumental: la combinación de la microextracción en fase sólida (SPME) con cromatografía líquida e ICP-MS como detector. Este primer apartado de introducción aborda la importancia de la especiación elemental y describe el acoplamiento de ICP-MS con cromatografía líquida. Asimismo, se trata brevemente el proceso de tratamiento de muestra y se describe la microextracción en fase sólida (SPME). Por último, se trata la problemática asociada a los OTCs así como los métodos analíticos para su determinación y se presentan las principales características de los analitos objeto de estudio.

### 3.1.1. Importancia de la especiación elemental

Los elementos traza juegan un papel fundamental en la actividad biológica, en la química del medio ambiente y en las características de los materiales. En lo que a la actividad biológica y medioambiental se refiere, la toma, acumulación, transporte, almacenamiento e interacción de los diferentes elementos en la naturaleza es fuertemente dependiente de su forma química específica<sup>1</sup>. De este modo, algunos elementos pueden ser desde esenciales a tóxicos o inocuos en función de la forma química (especie) en la que existen. Para éstos, la determinación del elemento total no resulta adecuada en la mayoría de los casos y se requiere la identificación y cuantificación de los estados de oxidación, asociaciones con ligandos y otras formas potenciales más complejas del elemento para su completa caracterización. Así, la

determinación de las formas químicas de los elementos en muestras biomédicas, medioambientales, nutricionales, industriales, geoquímicas y farmacéuticas es esencial para una evaluación precisa de sus beneficios y efectos tóxicos y, por tanto, de su impacto potencial para el medio ambiente y la salud.

En términos generales, la especiación elemental ha sido definida como el análisis que conduce a la determinación de las especies químicas particulares de un elemento en una muestra<sup>2</sup>. Según la IUPAC, las formas específicas de un elemento que difieren en su composición isotópica, conformación, estado de oxidación o electrónico, o en la naturaleza de sus sustituyentes unidos por complejación o covalentemente, pueden considerarse especies químicas distintas<sup>3</sup>. Es por ello que, estrictamente, siempre que se habla de un elemento presente en diferentes estados en estos términos, se debe considerar que ocurren diferentes especies. En la práctica, sin embargo, éstas pueden ser agrupadas y medidas conjuntamente en función de la importancia de las diferencias entre ellas para la comprensión del sistema objeto de estudio y de la capacidad para distinguirlas analíticamente.

La especiación ha evolucionado a lo largo de las últimas décadas convirtiéndose en una importante sub-disciplina de la Química Analítica. Gradualmente, ha quedado claro que la especiación elemental constituye el nexo entre dos áreas de la Química Analítica, la orgánica y la inorgánica, ya que combina y se vale de la mayoría de las metodologías y técnicas de ambos campos, entre las que destacan la cromatografía en sus diversos modos y las técnicas de detección elementales<sup>4</sup>. Hoy en día, el importante papel de los análisis de especiación queda reflejado en el elevado número de publicaciones anuales sobre el tema (más de 2500 en 2010<sup>5</sup>) y en la introducción gradual de especies químicas en lugar de concentraciones totales de elementos tanto en normas como en regulaciones. Estos desarrollos han sido posibles gracias a que diferentes disciplinas científicas, entre las que se pueden citar la Química Analítica, la Toxicología, la Medicina y la Biología entre otras, han cruzado sus respectivas fronteras.

### 3.1.2. Acoplamiento de cromatografía líquida a ICP-MS

En combinación con distintas técnicas de separación, principalmente cromatográficas, el ICP-MS se ha convertido en el más potente y versátil detector para análisis de especiación química, dados los bajos niveles de elementos traza presentes en la mayoría de matrices biológicas y medioambientales. Las técnicas de separación más empleadas son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de líquidos (LC), pero otras técnicas como la electroforesis capilar (CE) y el fraccionamiento en flujo mediante campos (FFF), han sido también utilizadas. En este apartado se describen aspectos importantes relacionados con el acoplamiento con LC, que constituye la base de este estudio.

La cromatografía líquida (LC) en conjunción con ICP-MS ha emergido como una de las mejores combinaciones para la separación y la detección elemental<sup>1</sup>. La LC es una técnica versátil, que debido a la diversidad de mecanismos de separación desarrollados, puede ser aplicada a una gran variedad de analitos de importancia medioambiental y biológica.

#### 3.1.2.1. Desarrollo histórico del acoplamiento de la cromatografía líquida con detectores elementales

Van Loon<sup>6</sup> y Suzuki<sup>7</sup> abrieron la puerta a la especiación mediante el acoplamiento de una separación cromatográfica seguida de un detector elemental específico. El acoplamiento LC/FAAS constituyó, de este modo, una primera aproximación a los estudios de especiación. El acoplamiento era simple en términos de instrumentación mediante la conexión directa de la columna de LC al nebulizador del sistema de AAS. Desafortunadamente, los límites de detección no eran lo suficientemente bajos para la mayoría de las aplicaciones y en consecuencia, los esfuerzos de investigación se centraron en mejorar la eficiencia del sistema de introducción de muestras (preconcentración *in situ*<sup>8</sup>, generación de hidruros en línea<sup>9,10</sup>, etc).

La espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) superó los pobres límites de detección de la FAAS. Sin embargo, la ETAAS no es compatible con la continua introducción de flujos de la cromatografía líquida. Aunque se publicaron varios artículos en el campo de la LC con ETAAS como detector<sup>11</sup>, nunca fue aceptada para estudios de especiación.

El desarrollo de la espectrometría de emisión óptica (OES) utilizando el ICP y el plasma inducido por microondas (MIP) como fuentes de atomización proporcionó dos ventajas frente a los detectores elementales ya existentes: mejores límites de detección y capacidad de detección multi-elemental. Los plasmas inducidos por microondas acoplados a espectrometría de emisión óptica (MIP-OES) demostraron ser apropiados para su acoplamiento con cromatografía gaseosa (GC)<sup>12, 13</sup>, y en el caso de la LC, se obtuvieron buenos resultados al acoplarla a ICP-OES<sup>14</sup>. Además, el amplio rango dinámico sobre cinco órdenes de magnitud abrió camino a numerosas aplicaciones<sup>15</sup>. Sin embargo, la LC-ICP-OES sufría de una pobre eficiencia en el transporte de muestra (típicamente 1-5%) y un ensanchamiento de picos bajo ciertas condiciones. Con el objetivo de mejorar esas limitaciones, se desarrollaron diferentes nebulizadores, como el ultrasónico<sup>16</sup>, así como técnicas para generar especies elementales volátiles de arsénico, selenio y mercurio<sup>17</sup>.

La llegada del ICP-MS a mitades de los 80 permitió obtener una mayor sensibilidad para el análisis de muestras reales, lo que abrió nuevos horizontes para el análisis elemental de trazas, siendo posible su acoplamiento a varias técnicas de separación. La primera aplicación de ICP-MS como detector específico de elementos para LC fue publicada por Thompson y Houk en 1986<sup>18</sup>. Desde entonces el número de trabajos sobre el tema ha crecido gradualmente.

Una de las principales ventajas del acoplamiento de la LC al ICP-MS es la sencillez de la conexión, de forma directa, de la salida de la columna cromatográfica con el nebulizador, gracias a la compatibilidad del ICP-MS con los flujos empleados habitualmente en cromatografía líquida. El acoplamiento se consigue de forma rápida y



barata por medio de un capilar de PEEK (poli-(éter-éter-cetona)). Además, los límites de detección de esta técnica híbrida se encuentran en el rango de los ng L<sup>-1</sup> <sup>19</sup>, aproximadamente tres órdenes de magnitud (dependiendo del elemento estudiado) por debajo de los detectores tradicionales para LC, como el UV-Vis. Sin embargo, existen ciertas limitaciones de compatibilidad que surgen de la composición de la fase móvil ya que la presencia de disolventes orgánicos, sales y tampones en algunas de las fases móviles empleadas pueden causar problemas de obstrucción de los conos y/o cambios en la sensibilidad<sup>20</sup>.

Por otro lado, el acoplamiento de la LC al ICP-MS es fuertemente dependiente del tipo de nebulizador empleado en el sistema de introducción de muestras. Así, la selección de un nebulizador cuyo flujo óptimo coincida con el flujo óptimo de la columna es crítico para lograr una separación y nebulización de la muestra eficientes<sup>21</sup>. La mayoría de las aplicaciones hacen uso del nebulizador concéntrico conectando la salida de la columna con la entrada del nebulizador mediante un tubo de un polímero inerte. La longitud del tubo debe ser minimizada para disminuir al máximo el volumen muerto y los consiguientes problemas de reproducibilidad debidos al ensanchamiento de los picos<sup>22</sup>.

### 3.1.2.2. Limitaciones en la utilización de ICP-MS como detector para LC

Probablemente el mecanismo de separación más comúnmente utilizado en cromatografía líquida es la fase reversa (RP). Al acoplarla a ICP-MS, la cromatografía líquida en fase reversa (RP-LC) resulta más atractiva que la de fase normal en términos de estabilidad de plasma, seguridad y generación de residuos. La viabilidad del acoplamiento RP-LC-ICP-MS se ve sin embargo afectada por la composición y el flujo de las fases móviles utilizadas. En el caso de la cromatografía en fase reversa, las fases móviles son polares, normalmente acuosas y con un porcentaje variable de modificador orgánico, como metanol, acetonitrilo, etanol o tetrahidrofurano para aumentar la selectividad entre las especies. La principal limitación de la RP-LC-ICP-MS radica en que la mayoría de los modificadores orgánicos no son compatibles con ICP-MS. Así, sólo pequeños porcentajes de metanol o etanol pueden introducirse en los instrumentos

ICP-MS utilizando sistemas de introducción de muestras convencionales, como el nebulizador concéntrico, sin comprometer seriamente la sensibilidad<sup>1</sup>. Esta incompatibilidad de los modificadores orgánicos con ICP-MS se debe a varios factores. En primer lugar, los modificadores orgánicos poseen diferente tensión superficial, densidad, velocidad de evaporación y presión de vapor que las disoluciones acuosas que normalmente se introducen al ICP-MS. La menor tensión superficial y la mayor velocidad de evaporación de los disolventes orgánicos causan una mayor distribución de gotas pequeñas en el aerosol<sup>23</sup>, lo que aumenta la eficiencia del spray; es decir, una mayor proporción de la muestra alcanza el plasma. La mayor velocidad de evaporación de los disolventes orgánicos también provoca que una mayor cantidad de la matriz orgánica sea transportada al plasma en forma de vapor<sup>24</sup>. Estos efectos combinados tienen como resultado un aumento de la carga del plasma, por lo que se requerirá más energía para vaporizar, atomizar e ionizar todas las moléculas que han llegado al mismo. Además, si llega gran cantidad de disolvente la pérdida de energía será muy grande, lo que puede llevar a una disminución de la temperatura del plasma e incluso a apagarlo<sup>25</sup>.

Estos fenómenos podrían explicar el hecho de que el acetonitrilo sea menos tolerado que el metanol por el ICP. Al mismo flujo, el plasma probablemente se cargue más con acetonitrilo que con metanol porque tanto la viscosidad como la tensión superficial de las mezclas agua-acetonitrilo son más bajas que para las mezclas agua-metanol. Además, se estima que la entalpía de atomización por mol de acetonitrilo gaseoso es un 30% superior que para el vapor de metanol a 298 K. Si se asume esta relación de la entalpía como válida a la temperatura del plasma, la temperatura del plasma disminuirá más con acetonitrilo que con metanol<sup>26</sup>.

Por otro lado, la temperatura del plasma puede transformar los carbonos del disolvente orgánico en depósitos de carbón negro en la antorcha así como en los conos de muestreo y separación, con la consiguiente disminución del rendimiento. Además, cuando se requieren tiempos de análisis largos, los orificios de los conos pueden verse parcial o

totalmente obstruidos, lo que se traduce en una pérdida de la sensibilidad global o en una pérdida completa de la señal<sup>27</sup>.

Actualmente se utilizan distintas estrategias para minimizar los mencionados efectos de los disolventes orgánicos en el ICP-MS:

- Para aumentar la estabilidad del plasma y contrarrestar la disminución de la temperatura se puede aumentar la potencia del plasma (hasta 1.7 kW). Una mayor potencia aumenta la energía transmitida al plasma y reduce, al menos parcialmente, los efectos negativos del aumento de la carga en el plasma<sup>26</sup>.
- La adición de un pequeño porcentaje de oxígeno al flujo de argón nebulizador (entorno al 10%) mitiga la formación de carbón negro. El oxígeno reacciona con el carbono de los disolventes orgánicos formando dióxido de carbono, que es eliminado junto con otros gases residuales del plasma con el flujo de gases de escape. La adición de oxígeno requiere la utilización de conos de platino más robustos en la interfase en lugar de los convencionales de níquel<sup>28</sup>, ya que el aumento de especies oxidadas derivado de la introducción de oxígeno puede erosionar los conos de Ni.
- El enfriamiento de la cámara de nebulización reduce asimismo la cantidad de disolventes orgánicos que alcanzan el plasma<sup>29</sup>, ya que disminuye la cantidad de vapor de disolvente que es transportado al plasma y por tanto, minimiza el problema.
- La sustitución de la antorcha por una de diámetro interno menor es otra estrategia por medio de la cual se consigue que la cantidad de disolvente que alcanza el plasma sea menor. Existen diseños específicos para aplicaciones en las que se introducen disolventes orgánicos al ICP-MS.

- El uso de columnas cromatográficas de menor calibre (inferior al estándar de 4.6 mm) en combinación con nebulizadores de micro-flujos constituye otro modo efectivo de minimizar el efecto del modificador orgánico<sup>27</sup>. En este sentido, el desarrollo de micro-nebulizadores como el nebulizador de inyección directa (DIN), el nebulizador de alta eficiencia (HEN), el nebulizador de inyección directa de alta eficiencia (DIHEN), el MicroMist, etc. ha aumentado el uso de columnas de diámetro estrecho minimizando el flujo de fase móvil introducida al ICP-MS. Con algunos de estos nebulizadores, que operan a 30-100  $\mu\text{L min}^{-1}$ , se puede obtener un 100% de eficiencia en el transporte de fase móvil<sup>2</sup>, haciendo posible la introducción de fases móviles consideradas típicamente incompatibles con ICP-MS, como aquellas que contienen acetonitrilo<sup>30</sup>.
- Otro modo de superar la incompatibilidad de la composición de la fase móvil con el ICP-MS consiste en una dilución post-columna del efluente para conseguir una concentración de disolvente orgánico tolerable por el plasma<sup>31</sup>. Sin embargo, esto supone una pérdida de sensibilidad, ya que con el efluente los analitos también son diluidos.

Una última consideración a tener en cuenta cuando se acopla cromatografía líquida en fase reversa a ICP-MS se refiere al modo de trabajo en gradiente. En 1998 Larsen<sup>32</sup> comprobó que la cámara de nebulización y el nebulizador pueden causar errores cuando se trabaja en esta modalidad de elución. De acuerdo con esta publicación, el disolvente orgánico se adhiere a las paredes de la cámara de nebulización y puede, a medida que el gradiente avanza, causar un efecto de incremento de la señal en elementos de alto potencial de ionización, como el arsénico o el selenio. Asimismo, se puede dar una alteración de la sensibilidad en el detector y efectos de memoria en el sistema de introducción de muestras. En eluciones isocráticas, en cambio, la composición de la fase móvil se mantiene constante en todas las partes del sistema de introducción de muestra, por lo que no ocurren cambios en la señal. A pesar de ello, hoy en día existen estrategias que permiten trabajar en gradiente, como son las unidades de desolvatación para eliminar los disolventes orgánicos del aerosol de muestra<sup>33-35</sup>, o la

adición post-columna de un flujo constante para amortiguar los cambios producidos en la señal de los analitos debidos al disolvente durante la elución en gradiente<sup>36-38</sup>. Otra reciente propuesta analítica para superar los efectos de separaciones en gradiente consiste en utilizar un flujo en gradiente invertido post columna, de tal manera que el porcentaje de disolvente orgánico que es introducido en el ICP-MS se mantiene constante<sup>39, 40</sup>.

### 3.1.3. Preparación de muestra: aplicación de SPME a la especiación de elementos

La preparación de muestra supone aproximadamente el 60% del tiempo consumido en cada análisis y más del 50% de las fuentes de error, siendo estos porcentajes incluso superiores en los análisis de especiación, donde las matrices de la muestra suelen ser complejas, la concentración de las especies baja y su distribución heterogénea.

La etapa de extracción puede considerarse uno de los campos más desafiantes de la especiación. Muchas veces comprende tediosas etapas que exigen invertir mucho tiempo, presentan el riesgo adicional de interconversión entre especies y/o degradación de las mismas. Como es sabido, la tendencia de los métodos actuales es la reducción del tiempo de análisis minimizando al máximo el número de etapas, así como el volumen de disolventes utilizados.

En este contexto, las aplicaciones en las que el tratamiento de muestra se lleva a cabo en línea con el detector resultan ventajosas y van cobrando mayor relevancia, ya que reducen el consumo de disolventes, la contaminación de muestra y disminuye el tiempo total del análisis<sup>41</sup>. Además, la sensibilidad y selectividad del ICP-MS pueden mejorar utilizando procedimientos de preconcentración y/o separación en línea que incluyen SPE<sup>42</sup> o SPME.

La SPME cumple con los mencionados requisitos, ya que, como se verá a continuación, elimina la utilización de disolventes orgánicos, el tratamiento de muestra es mínimo e

integra en una única etapa la extracción y concentración de los analitos. La aplicación de la SPME a la especiación de elementos traza ha sido una de las áreas de mayor desarrollo de la SPME desde mitades de los noventa, cuando Cai y Bayona<sup>43, 44</sup> publicaron innovadores artículos dedicados a la determinación de metilestaño y metilmercurio en muestras ambientales. Desde entonces se ha aplicado a la determinación de diversas especies, entre las que destacan las organomercúricas, las orgánicas de plomo y las organoestánicas, importantes especies organometálicas en el medio ambiente. En la mayoría de estas aplicaciones la SPME conjuga con GC, en las que la utilización de ICP-MS como detector resulta muy atractiva por su elevada sensibilidad<sup>45, 46</sup>. Sin embargo, hasta la fecha de realización del presente trabajo, el acoplamiento de la SPME *on-line* con cromatografía líquida e ICP-MS como detector, no ha sido descrito en la bibliografía.

A continuación se exponen algunos aspectos teóricos de la técnica SPME.

#### 3.1.3.1. Microextracción en fase sólida

La microextracción en fase sólida (SPME) fue desarrollada para solventar la necesidad existente de una rápida preparación de muestra tanto en el laboratorio como *in-situ*. Los primeros conceptos en la aplicación de la SPME fueron publicados en 1989 por Belardi y Pawliszyn<sup>47</sup>, y el rápido desarrollo posterior trajo consigo la aparición del primer dispositivo de SPME en 1990<sup>48</sup>. A pesar de que la SPME fue introducida para analizar compuestos relativamente volátiles en el terreno medioambiental, en la última década se ha extendido al análisis de una gran variedad de matrices (líquido<sup>49</sup>, sólido<sup>50</sup> y gas<sup>51</sup>) y a una amplia variedad de analitos, desde compuestos polares a no-polares<sup>52</sup>.

La SPME se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice, seguida de la desorción de los mismos mediante la aplicación de temperatura o un disolvente orgánico<sup>53</sup>. La fibra sólida de sílice, corta y delgada, está recubierta de una película de material sorbente (denominado *película* o *fase estacionaria*), en la mayoría de los casos polimérico, que es estable e inerte incluso a elevadas

temperaturas. Su pequeño tamaño y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa, facilitando su manipulación. En la Figura 3.1 se muestra un esquema del dispositivo comercial de SPME. Este dispositivo posee además una variante para posibilitar la inyección automática. También está disponible comercialmente un dispositivo de SPME diseñado para realizar análisis de campo que presenta algunas pequeñas diferencias con respecto al dispositivo convencional mostrado en la Figura 3.1<sup>54</sup>.

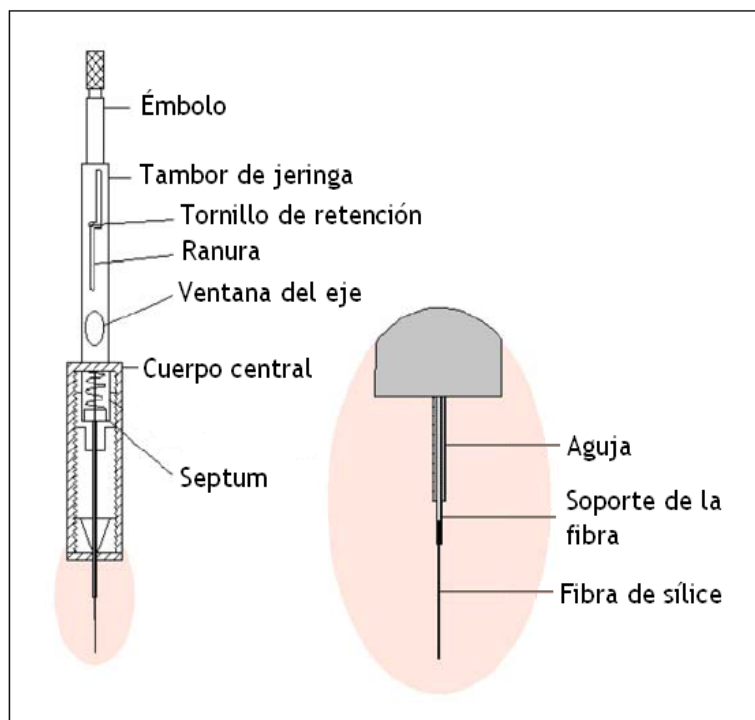


Figura 3.1. Esquema del dispositivo comercial de SPME<sup>55</sup>.

Además de las fibras como medio de extracción, existen otras variantes de la SPME, como son la denominada *in-tube* SPME<sup>56-58</sup> y la SPME en membrana<sup>59, 60</sup>.

### ***Procedimiento general de la SPME***

En la SPME, la fase estacionaria de la fibra se expone a la muestra durante un periodo determinado de tiempo hasta que se alcanza el equilibrio de los analitos entre la matriz

y la fase estacionaria. Esta condición de alcanzar el equilibrio estacionario entre ambas fases no siempre es necesaria, pudiéndose trabajar a tiempo controlado de exposición, para evitar elevados tiempos de análisis<sup>61, 62</sup>. Finalizado el periodo de extracción, la fibra se introduce en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases (desorción térmica, la más frecuentemente utilizada en las aplicaciones de SPME) o en una cámara de desorción utilizando un solvente orgánico (interfase para LC) donde se lleva a cabo la desorción de los analitos adsorbidos y su posterior separación y cuantificación. Por lo tanto, la SPME consta de dos etapas diferenciadas: la extracción de los analitos desde la muestra a la fibra y la desorción de los mismos mediante la técnica analítica seleccionada.

La extracción, o reparto de los analitos entre la muestra y la fibra, puede realizarse desde el propio seno de la muestra líquida (inmersión directa, DI-SPME) o desde el espacio de cabeza generado en el vial (en el espacio de cabeza, HS-SPME). Una tercera forma menos aplicada es la denominada SPME con protección de membrana<sup>56, 63</sup>, en la que se coloca una membrana semipermeable alrededor de la fibra para evitar que compuestos de elevado peso molecular, como ácidos húmicos o proteínas, lleguen hasta la fibra y puedan dañarla.

En cuanto a la desorción de los analitos, la desorción térmica es el modo más sencillo de desorber los analitos de la fibra. Se emplea en análisis por GC y variables como el incremento de temperatura, la disminución de los coeficientes de partición película/gas o un flujo constante de gas portador ayudan a desorber los analitos desde la fibra al puerto de inyección. En el caso de los compuestos que son térmicamente inestables o poco volátiles y por lo tanto no se pueden determinar directamente mediante GC, la combinación de la SPME con LC es más adecuada, utilizándose un disolvente orgánico para desorber los analitos (desorción química). Ésta se puede llevar a cabo en línea (*on-line*) o bien fuera de línea (*off-line*)<sup>64</sup>.



La desorción *off-line* respecto al sistema cromatográfico se realiza introduciendo la fibra en una disolución que permita la desorción de los analitos y sea compatible con el recubrimiento de la fibra y con la técnica analítica posterior<sup>55</sup>.

En el caso de utilizar la desorción *on-line* con LC se debe utilizar una interfase<sup>65</sup>, como la comercializada por Supelco (Figura 3.4). Este tipo de desorciones pueden llevarse a cabo en modo dinámico o estático. En la desorción dinámica la fibra se introduce en la cámara de desorción e inmediatamente se cambia la posición de la válvula de forma que la fase móvil pasa a través de la cámara y los analitos son desorbidos al mismo tiempo que son arrastrados hacia la columna analítica. Este modo de desorción en ocasiones puede provocar un ensanchamiento de los picos ya que la fase móvil puede no tener la suficiente fuerza elutrópica como para proporcionar una rápida desorción de los mismos<sup>64</sup>. Cuando se trabaja en este modo de desorción, el tiempo que la fase móvil pasa a través de la cámara de desorción es el único parámetro a optimizar.

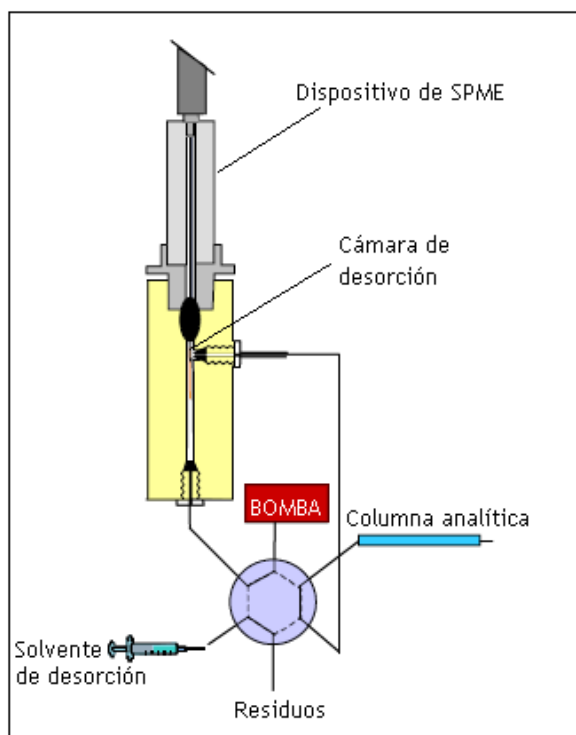


Figura 3.2. Interfase SPME/LC comercial<sup>55</sup>.

La desorción en modo estático puede evitar este problema de ensanchamiento de los picos. Este modo de desorción consiste en la introducción de la fibra de SPME en la cámara de desorción de la interfase durante un tiempo determinado en presencia de la misma fase móvil u otro solvente adecuado (introducido en la cámara de desorción con una jeringa) de manera que se produzca la desorción de los analitos. Finalizado este tiempo, se gira la válvula de modo que la fase móvil pasa a través de la cámara de desorción y arrastra los analitos hacia la columna analítica. En este caso, el disolvente de desorción y el tiempo de permanencia de la fibra en la cámara son los parámetros que se deben optimizar.

Debido a las buenas características que presenta la SPME como técnica de preconcentración, también ha sido estudiado su acoplamiento tanto fuera de línea como en línea con la electrofóresis capilar (CE)<sup>66, 67</sup>.

### ***Tipos de fibras***

La afinidad de la fibra por los analitos depende principalmente del tipo de película que la recubre y es crucial en el proceso debido a que tanto la matriz como la fibra seleccionada compiten por los analitos. Para la elección de una fibra determinada se deben tener en cuenta ciertas características de los analitos a extraer, como son el peso molecular, la polaridad y el rango de concentración en la muestra. Los analitos pequeños y polares presentan una extracción más complicada debido a que este tipo de compuestos son solubles en agua y son muy difíciles de extraer. Como regla general de selección se aplica la hipótesis de "igual prefiere a igual".

Todas las fibras fabricadas contienen una base de sílice fundida cuyo diámetro es, en la mayoría de los casos, de 11  $\mu\text{m}$ . En la Tabla 3.1 se recogen las principales características de las fibras SPME según la película que las recubre, así como sus usos y aplicaciones recomendados.

Tabla 3.1. Características y principales aplicaciones de las fibras SPME según la fase estacionaria.

Tipo de película	Polaridad	Color	Aplicación	pH	T <sup>a</sup> máx	Aplicaciones recomendadas	
PDMS	Apolar	7 µm	Verde	GC/LC	2-10	280 °C	Compuestos orgánicos no polares: VOCs, hidrocarburos policíclicos aromáticos, pesticidas organoclorados
		30 µm	Amarillo		2-11	280 °C	
		100 µm	Rojo		2-11	340 °C	
PA	Polar	Blanco	GC/LC	2-11	320 °C	Compuestos orgánicos polares como triazinas, pesticidas organofosforados y fenoles	
PDMS/ DVB	Bipolar	65 µm	Azul	GC	2-11	270 °C	De utilidad general: hidrocarburos aromáticos, aminas aromáticas, VOCs
StableFlex		65 µm	Rosa	GC			
CAR/ PDMS	Bipolar	75 µm	Negro	GC	2-11	320 °C	VOCs, hidrocarburos
		85 µm	Azul claro	GC			
DVB/CAR/PDMS	Bipolar	50/30 µm	Gris	GC	2-11	270 °C	-
CW/TPR	Polar	50 µm	Violeta	LC	5-10	240 °C	Surfactantes aniónicos, aminas aromáticas
CW/DVB	Polar	65 µm	Naranja	GC	2-9	260 °C	Compuestos orgánicos polares como alcoholes, cetonas, nitro aromáticos
		70 µm	Amarillo-verdoso	GC			
CW/PEG	Polar	60 µm	Morada	GC	2-9	250 °C	-

### *Desventajas en el proceso de SPME*

Una de las principales desventajas de la SPME radica en que las fibras empleadas son frágiles y se rompen fácilmente si no se tiene cuidado en su manejo. Su calidad depende del fabricante y, a veces, se encuentran diferencias de uno a otro lote. Como consecuencia de ésto es necesario el acondicionamiento de cada fibra antes de su utilización. Este proceso debe llevarse a cabo en cada fibra nueva y también en aquellas que no han sido utilizadas durante un tiempo. El acondicionamiento para GC requiere la aplicación de una temperatura determinada durante un tiempo según las

especificaciones del fabricante. Para LC el acondicionamiento previo se realiza insertando las fibras en la interfase o cámara de desorción, de manera que permanezcan en contacto con el disolvente al que van a estar expuestas en la desorción (la fase móvil si se va a emplear desorción dinámica, o el disolvente seleccionado para la desorción si ésta es estática).

Otra de las limitaciones que presentan las fibras es el fenómeno del “efecto memoria” (*carry-over*), un problema que a veces resulta difícil de eliminar. Este se debe a una desorción incompleta de los analitos de la fibra y genera restos de analitos en sucesivos procesos de extracción/desorción. Por ello, debe realizarse una segunda desorción de la fibra para comprobar que no existe *carry-over*, tanto en cromatografía de gases (GC) como en cromatografía de líquidos (LC).

Cuando la muestra presenta una elevada cantidad de sustancias en suspensión, la película que recubre la fibra puede dañarse durante el proceso de agitación. También puede ocurrir que compuestos de elevado peso molecular queden adsorbidos de forma irreversible a la fibra, lo que puede alterar sus propiedades y hacerla inservible.

Los dos últimos problemas mencionados anteriormente parecen ser los responsables de la baja reproducibilidad y linealidad que a veces se observa <sup>43, 68</sup>.

### 3.1.4. Compuestos organoestánicos

A día de hoy se conocen más de 800 compuestos organoestánicos (OTCs), la mayoría de origen antropogénico o resultantes de la interacción del Sn elemental con diferentes sistemas químicos. La utilización extendida de estos compuestos ha llevado a su acumulación en varios ecosistemas. Dada la elevada toxicidad del tributilestano (TBT), incluso a niveles muy bajos de concentración, éste ha recibido la mayor atención. Sin embargo, otros organoestánicos, como el trifenilestano (TPhT), son asimismo altamente tóxicos, por lo que su presencia y transformación en el medio ambiente también han sido investigadas. Aunque la amenaza que los OTCs suponen para el

medio ambiente ha sido ya reconocida y se han hecho restricciones legislativas particulares para su uso, como se detalla más adelante, la contaminación ambiental debida a estos compuestos seguirá representando un problema significativo en los próximos años.

#### 3.1.4.1. Propiedades físico-químicas de los OTCs

Las especies organoestánicas son compuestos organometálicos caracterizados por un átomo de estaño unido covalentemente a uno o más sustituyentes orgánicos (metilo, etilo, butilo, propilo, fenilo, etc). La fórmula general de los OTCs es  $R_nSnX_{4-n}$ , donde R representa un grupo alquilo o arilo, n va de 1 a 4 (resultando, por tanto, en los cuatro diferentes tipos de organoestánicas, las especies mono-, di-, tri- y tetra-organostánicas), y X es un anión o grupo equivalente (F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, etc.). El número de enlaces Sn-C y la longitud de las cadenas alquiladas tienen un profundo efecto en las propiedades físicas y químicas de los OTCs.

Los enlaces Sn-C son estables en presencia de agua, oxígeno atmosférico o calor, incluso a temperaturas superiores a los 200 °C<sup>69</sup>, de modo que la descomposición termal no es significativa en condiciones ambientales. Sin embargo, la radiación ultravioleta, los ácidos fuertes y los agentes electrófilos rompen fácilmente los enlaces Sn-C.

#### 3.1.4.2. Toxicidad de los OTCs

Mientras que las formas inorgánicas de estaño son consideradas no tóxicas, sus derivados orgánicos presentan un complejo patrón de toxicidad. Los efectos biológicos de las especies organoestánicas dependen principalmente del número y del tipo de fracciones orgánicas unidas al átomo de estaño. La toxicidad del anión (X) en el caso de los organoestánicos iónicos es de una importancia subordinada, excepto cuando el grupo aniónico es tóxico por sí mismo, en cuyo caso los efectos biológicos del catión y el anión son acumulativos.

Las especies organoestánnicas más tóxicas son aquellas que poseen tres grupos alquilo o arilo, mientras que los di- y mono- organoestánnicos presentan una toxicidad más leve<sup>70</sup>. Los organoestánnicos tetrasustituidos tienen muy poca o nula toxicidad.

Entre los diferentes triorganoestánnicos existen notables diferencias en cuanto al perfil y alcance de su toxicidad, dependiendo de la longitud de la cadena alquilada (Tabla 3.2). Así, el aumento de la longitud de la cadena alquilada va acompañado de una caída en su actividad biocida, siendo las especies con cadenas largas como los compuestos octilestánnicos esencialmente no tóxicos para los mamíferos.

Tabla 3.2. Perfil de toxicidad de OTCs<sup>71</sup>.

Radical R	Especie diana
CH <sub>3</sub> (metilo)	Insectos
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> (etilo)	Mamíferos
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> (propilo)	Bacterias gram-negativas
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> (butilo)	Bacterias gram-positivas, peces, algas, mejillones, moluscos y hongos
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (fenilo)	Hongos, moluscos y peces
C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> (ciclohexilo)	Ácaros, peces

El TBT es una de las especies de estaño más tóxicas. Al contrario que para los mamíferos, el TBT presenta elevada toxicidad para los organismos acuáticos. Se ha demostrado que incluso a niveles de pocos ng L<sup>-1</sup> ocurren envenenamientos agudos de organismos acuáticos sensibles como algas, zooplancton, moluscos y larvas de peces<sup>72</sup>. El TBT causa a los seres vivos (desde bacterias a peces) una amplia gama de efectos dañinos, llegando incluso a ser letal. Su actuación puede manifestarse como daños al ARN, neurotoxicidad, alteraciones en el crecimiento, producción de anomalías anatómicas y reproductoras (como deformaciones en la concha de ostras en crecimiento y desarrollo desparejado de las gónadas de las ostras adultas, o retraso en el crecimiento de la concha de mejillones<sup>73</sup>), alta mortalidad de larvas de ostras y otros bivalvos, bioacumulación tisular, inducción de cambios de comportamiento<sup>74</sup> y disfunciones inmunológicas<sup>75</sup>.

Además, el TBT es altamente tóxico para los moluscos marinos y puede causar masculinización de hembras (fenómeno conocido como *imposex*) en gasterópodos. Una de las consecuencias del imposex en las hembras de caracoles marinos (*Nucella lapillus*) es el bloqueo del oviducto, que impide la liberación de las cápsulas de los huevos y deja, así, a las hembras estériles. La acumulación de cápsulas abortadas parece ser, finalmente, letal para las hembras<sup>76</sup>.

El TPhT también muestra toxicidad elevada para la vida acuática. Fent<sup>77</sup>, por ejemplo, demostró en 1996 que incluso a niveles de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  se observan efectos crónicos en el sistema inmune en la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*).

### 3.1.4.3. Aplicaciones de los OTCs

Los OTCs poseen un gran número de aplicaciones. A continuación se comentarán las principales.

#### ***Estabilizadores de PVC***

Más de dos tercios de la producción anual de OTCs se utilizan en la industria del plástico, suponiendo un 3.5% del consumo total de estaño el añadido como OTCs para estabilizar el PVC<sup>4</sup>. Los estabilizadores de PVC se basan siempre en los grupos metilo, butilo y octilo.

#### ***Pinturas anti-incrustantes***

La espesa costra de organismos vivos (principalmente microalgas, esponjas, moluscos y percebes) que crece adherida a estructuras sumergidas de origen antrópico (casco de embarcaciones, plataformas petrolíferas, etc.) recibe el nombre de *fouling*. Estos organismos se fijan al sustrato desarrollando un rápido crecimiento y vasto potencial reproductor, que acelera los procesos de corrosión de los materiales y aumenta el consumo de fuel en el caso de las embarcaciones<sup>74</sup>. Para evitar las pérdidas económicas derivadas de este crecimiento, a partir de los años 60 las empresas comenzaron a tratar

sus embarcaciones y plataformas con pinturas que en su composición contenían sustancias biocidas, particularmente basadas en óxido cuproso ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Sin embargo, el reducido tiempo de vida útil de este tipo de baños (inferior al año), hizo que a principios de los 70 se introdujera el TBT en las pinturas de los barcos, ofreciendo protección a los mismos por periodos significativamente superiores a un año.

### ***Usos en agricultura***

Desde principios de la década de los sesenta tanto el hidróxido de trifenilestaño como el acetato de trifenilestaño han sido utilizados para controlar el tizón tardío o mildiu de la patata, producido por *Phytophthora infestans*, en remolachas azucareras, apio, zanahorias, cebollas, arroz y patatas, y también para prevenir enfermedades de plantas tropicales en cacahuetes, café y cacao. Se conocen muy pocos datos sobre la persistencia y destino de estos compuestos en el suelo<sup>4</sup>.

#### **3.1.4.4. Situación legislativa**

El impacto del TBT en los organismos marinos presionó a muchos gobiernos para restringir su uso. Francia fue el primer país que prohibió la aplicación de pinturas anti-incrustantes con TBT en su composición en embarcaciones de menos de 25 metros de eslora en 1982. Inglaterra le siguió en 1987, y similares restricciones fueron adoptadas por otros países de Europa, Australia y Norteamérica<sup>78</sup>. Siguiendo esta línea, en 1990 el *Marine Environment Protection Committee* (MEPC) de la *International Maritime Organization* (IMO) emitió una resolución sobre medidas para controlar los impactos adversos potenciales asociados al uso de pinturas anti-incrustantes con TBT<sup>79</sup>. En noviembre de 1999, el MEPC aprobó otra resolución proponiendo una prohibición total de OTCs en pinturas anti-incrustantes<sup>4</sup>. Sobre esta base, el MEPC promovió una legislación que imponía:

- la prohibición de aplicar pinturas anti-incrustantes con TBT a partir del 1 de enero de 2003
- la obligación de eliminar de los barcos todo tipo de pintura con TBT a partir del 1 de enero de 2008



Además, se estableció la necesidad de promover el desarrollo y utilización de alternativas ambientalmente seguras para las pinturas anti-incrustantes con TBT<sup>80</sup>.

En la Unión Europea los OTCs están considerados contaminantes prioritarios tanto en el Registro de Emisiones Contaminantes (2000/479/EC) como en la Directiva Marco del Agua (2000/60/EC). Esta Directiva es el mayor instrumento comunitario para el control de descargas puntuales y difusas de sustancias peligrosas. La Decisión nº 2455/2001/EC de 20 de noviembre de 2001, que modifica la política de aguas de la Directiva Marco del Agua, define 11 sustancias peligrosas prioritarias, entre las que se incluyen los compuestos de TBT, cuyos vertidos, emisiones y pérdidas deben interrumpirse. Se plantea como objetivo que en un plazo inferior a 20 años sus respectivas concentraciones en el medio ambiente acuoso se sitúen en valores próximos a cero. Cabe destacar que esta Decisión es uno de los primeros actos legislativos que requieren análisis de especiación. Aunque la Unión Europea también ha prohibido, mediante la Decisión 2002/62/EC, la comercialización y utilización de OTCs como biocidas en pinturas anti-incrustantes en embarcaciones destinadas a ser utilizadas en canales marinos, costeros, estuarios, vías de navegación interior y lagos, todavía no se ha establecido ningún criterio de calidad para el agua. En el caso de la regulación española, el Real Decreto 995/2000 establece que el sumatorio de compuestos de butilestano en vertidos efectuados en las aguas superficiales continentales debe ser inferior a 20 ng L<sup>-1</sup>, pero todavía no existe legislación para muestras de agua marina.

La limitación del uso de TBT está conduciendo a una utilización renovada de las antiguas pinturas con cobre y/o a la utilización de nuevas pinturas que incorporan altos niveles de cobre. Además, se han desarrollado diversas alternativas al TBT. Sin embargo, los efectos de los nuevos biocidas que actúan como agentes anti-incrustantes son poco conocidos y existe cierta preocupación sobre su supuesto impacto en organismos no-diana.

### 3.1.4.5. Métodos analíticos para la determinación de OTCs

Debido a la problemática asociada a los OTCs (tanto medioambiental, de salud pública como económica) y a la legislación vigente derivada de la misma, se hace necesario disponer de metodologías analíticas capaces de determinar OTCs a niveles traza en distintas matrices.

La mayoría de los métodos utilizados hoy en día para los análisis de especiación de OTCs se basan en el uso de técnicas acopladas, es decir, en la combinación de una técnica de separación adecuada con un detector molecular o elemental. Los requisitos que debe cumplir la técnica analítica son considerablemente estrictos, ya que se requieren límites de detección incluso a niveles de  $\text{ng L}^{-1}$ . Al mismo tiempo, la selectividad debe ser lo suficientemente elevada como para evitar interferencias debidas a la matriz. Por estos motivos, los procedimientos utilizados típicamente comprenden las siguientes etapas<sup>81</sup>:

- extracción y/o enriquecimiento de la matriz
- derivatización de la especie organoestannica iónica, en el caso de la cromatografía de gases
- limpieza (si resulta necesaria)
- separación cromatográfica
- detección selectiva

La cromatografía de gases (GC) acoplada a métodos de detección elementales es la técnica más ampliamente utilizada para la determinación de OTCs y proporciona su separación con muy buena resolución<sup>81</sup>. Se han acoplado diferentes detectores elementales a GC para especiación de estaño, como la espectroscopía de absorción atómica (AAS)<sup>82</sup>, la detección de emisión atómica (AED)<sup>83</sup>, la emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP-AES)<sup>45</sup> y la espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)<sup>84</sup>. Cabe indicar que los OTCs han sido detectados mediante sistemas de cromatografía de gases-espectrometría de masas convencional (GC-MS) con una sensibilidad comparable a la de la cromatografía de gases con detector de emisión atómica (GC-AED)<sup>85</sup>. Sin embargo, y a pesar de sus

elevados costes de inversión y operación, el uso de GC-ICP-MS se está extendiendo cada vez más para el análisis de OTCs<sup>46, 86</sup> por su elevada sensibilidad, superior a la del resto de técnicas comunes. Además la GC-ICP-MS facilita la determinación multi-elemental simultánea, permitiendo analizar especies de varios elementos en un único análisis<sup>87</sup>.

Debido a que las especies iónicas de los organoestánicos no son volátiles, todas las técnicas basadas en GC requieren su conversión a derivados más volátiles. Sin embargo, esta derivatización puede originar variaciones en las recuperaciones de las especies dependiendo de los componentes de la matriz<sup>88</sup>. Las técnicas más utilizadas para la derivatización de los OTCs son: (a) generación de hidruros (b) derivatización con reactivo de Grignard (c) alquilación con tetraetilborato sódico ( $\text{NaBEt}_4$ ). El uso de éste último ha conseguido establecerse casi totalmente como método de derivatización en la especiación del estaño<sup>89</sup>.

Al contrario que los métodos basados en GC, la cromatografía líquida (LC) ofrece la ventaja de evitar la etapa de derivatización, minimizando el tratamiento de muestra, lo que hace al procedimiento menos susceptible a problemas de contaminación y pérdidas de analito. Además se evita también la posibilidad de conversión de unas especies a otras y la pérdida de la integridad de cada especie. Desde un punto de vista práctico, como ya se ha visto, el acoplamiento de la cromatografía líquida a ICP-MS es más directo que el de la cromatografía de gases. Sin embargo, para la cromatografía líquida el rango de compuestos que pueden ser analizados en un único análisis y el número de detectores que dan sensibilidad comparable a los de GC son limitados.

Los detectores empleados para la determinación de OTCs tras su separación por LC van desde los que no son específicos de elementos (sistemas de detección por voltamperometría diferencial de pulsos<sup>90</sup> o UV<sup>91</sup>), a los específicos de elementos, como la absorción atómica (con llama<sup>92</sup> u horno de grafito<sup>82</sup>), fluorescencia<sup>93</sup>, ionización láser<sup>94</sup>, fluorescencia atómica con excitación por láser<sup>95</sup>, ICP-OES<sup>96, 97</sup> o ICP-MS<sup>98</sup>. En la última década, se han descrito métodos de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) (con ionización química a presión atmosférica

(APCI)<sup>99</sup> o electrospray (ESI)<sup>100, 101</sup>) para el análisis de OTCs. La ventaja de la detección mediante espectrometría de masas con una ionización suave radica en la conservación de la integridad estructural de los analitos, que puede ayudar a elucidar la identidad de los mismos en caso de duda<sup>101</sup>.

Mientras que la separación mediante LC es generalmente más pobre que por GC, las ventajas de su uso son, con todo, convincentes, particularmente si se utiliza un ICP-MS, altamente sensible, como detector.

Independientemente de la técnica de separación, la utilización de un ICP-MS como detector ofrece la posibilidad de cuantificación mediante dilución isotópica (ID), que constituye un recurso único para los análisis de especiación altamente precisos y exactos<sup>88</sup>. Como se verá en el siguiente capítulo, esta técnica de cuantificación no se ve afectada por los errores típicos involucrados en los análisis de especiación y ha sido ya aplicada para la determinación de compuestos butil- y fenilestánicos en diferentes matrices ambientales<sup>102, 103</sup>. La GC-ICP-MS en combinación con trazadores isotópicos de cada especie (*species-specific isotope dilution, SS-ID*) ha sido utilizada para realizar estudios de degradación de OTCs<sup>104</sup>. Sin embargo, la ID requiere un conocimiento previo de la muestra para doparla con la cantidad adecuada de analito marcado y además, las formas isotópicamente marcadas de las especies no siempre están comercialmente disponibles y, si lo están, son caras.

Cabe destacar que recientemente se han publicado varios trabajos en los que la técnica de separación empleada para la especiación de OTCs es la electroforesis capilar utilizando ICP-MS como técnica de detección<sup>105, 106</sup>.

En lo que a los protocolos utilizados para la extracción de especies organoestánicas se refiere, éstos incluyen (entre otros) sonicación, extracción con disolventes, calentamiento y extracción asistida por microondas empleando disolventes como hidróxido de potasio, ácido clorhídrico, ácido acético y metanol (Ver Tabla 3.3). Los extractos pueden ser analizados directamente (LC) o derivatizados (GC). También la extracción en fase sólida

(SPE) ha sido aplicada a los OTCs, basándose la mayoría de los métodos en la preconcentración de la muestra en discos de C18<sup>107</sup>. En los últimos años se ha introducido el uso de polímeros de impresión molecular (MIPs) como material de SPE para sensores y como fase estacionaria en columnas de cromatografía líquida, aunque aun es una herramienta emergente<sup>108, 109</sup>. Asimismo, una nueva técnica aplicada a la extracción y preconcentración de organoestánicos es la microextracción líquida dispersiva (DLME), consistente en la aplicación de un disolvente no miscible con agua que se pone en contacto con la muestra acuosa a través de un disolvente dispersante soluble en ambos medios<sup>110</sup>.

La SPME constituye otra interesante alternativa para la extracción de los OTCs, normalmente utilizada en conjunción con derivatizaciones en medio acuoso para su posterior separación por GC. Las especies se extraen directamente desde la disolución o desde el espacio de cabezas, siendo esta última la opción más habitual por la alta volatilidad de las especies derivatizadas. En la mayoría de los procedimientos analíticos la cromatografía de gases es acoplada a sistemas de detección específicos de elementos, como emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP-AES), detector fotométrico de llama (FPD) o ICP-MS<sup>111</sup>. El detector fotométrico de llama pulsado (PFPD) ha sido ampliamente utilizado por su mayor sensibilidad en comparación con el convencional (FPD). El grupo de Potin-Gautier evaluó estos cuatro detectores empleados para la especiación de OTCs tras SPME y una separación por GC<sup>45</sup>. En general, con estos detectores pueden conseguirse límites de detección inferiores a 500 pg L<sup>-1</sup>. El ICP-MS es el detector más sensible (con LODs entre 0.6 y 20 pg L<sup>-1</sup>); sin embargo, el PFPD, bastante selectivo y sensible, resulta una buena alternativa, con LODs sólo aproximadamente 2-10 veces más altos que para el ICP-MS. El PFPD puede ser especialmente adecuado para especies butiladas de estaño (LODs entre 1 y 4 pg L<sup>-1</sup>), considerando sus bajos costes de adquisición y operacionales. A pesar de que las técnicas GC-FPD y GC-MIP-AES son las más comunes para la determinación de OTCs, sus LODs son algo más elevados (inferiores a 200 pg L<sup>-1</sup> excepto para el TPhT).

La literatura recoge muy pocas publicaciones sobre SPME combinada con cromatografía líquida para la especiación de estaño. Wu y cols.<sup>112</sup>, en 2001, emplearon la denominada *in-tube* SPME acoplada a cromatografía líquida con ESI-MS para la determinación de TBT, con un LOD de 0.05 ng mL<sup>-1</sup>. Gbatu y cols.<sup>113</sup>, por su parte, emplearon SPME/LC-UV para determinar OTCs junto con otras especies organometálicas. La combinación instrumental SPME/LC-ICP-MS no ha sido descrita con anterioridad aunque cabe mencionar que Mester y cols.<sup>114</sup> desarrollaron un método de SPME con ICP-MS, sin cromatografía, para TBT basado en la generación de cloruros en el espacio de cabezas para la SPME con un ICP-TOF-MS como detector y utilizando un puerto de introducción de muestras termostatzado.

La precisión de los resultados obtenidos con SPME para OTCs se encuentra típicamente entre un 5 y un 15% de desviación estándar relativa (RSD)<sup>115</sup>. Para mejorar la precisión de la cuantificación, se pueden aplicar técnicas de dilución isotópica. Sin embargo, la adaptación extendida a esta técnica de cuantificación se ve limitada porque, como ya se ha comentado, sólo existen patrones enriquecidos isotópicamente de un número limitado de especies organoestánicas. El primer estudio sobre ID en combinación con SPME y GC-MS para la determinación de OTCs fue publicado por Bancon Montigny y cols.<sup>116</sup>.

La Tabla 3.3 recoge un resumen de referencias bibliográficas de la última década (2000-2010) en las que se han analizado especies organoestánicas, principalmente en matrices medioambientales y biológicas. Se ha prestado especial atención a aquellas en las que se ha aplicado SPME.

.

Tabla 3.3. Características de métodos analíticos recientes (2000-2010) para la especiación de estaño.

Especies	Matriz	Tratamiento de muestra	Técnica	LOD <sup>a</sup>	Autor	Año
MBT, DBT, TBT, TPhT	Mejillón, ostra	UPE	LC(Columna MIP)- ICP-MS	30-100	Gallego-Gallegos <sup>109</sup>	2010
TMT, TET, TPrT, TBT	Organismos acuáticos	MAE	CE-ICP-MS	2000-7000*	Yang <sup>106</sup>	2010
MBT, DBT, TBT (y especies de Hg y Pb)	Aguas (río y mar)	SPME: 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 15 min, HS	GC-MS GC-MS-MS	1.7 - 12.9 6.6 - 11.8	Beceiro-Gonzalez <sup>117</sup>	2009
MBT, DBT, TBT	Agua, sedimento	SPME: 100 µm PDMS, 15 min, HS	GC-FID	3.3 - 71.5	Chafer Pericas <sup>118</sup>	2009
FBTO	Mosto, vino	SPME: 100 µm PDMS, 45 min, HS	GC-AED	15 -30	Montes <sup>119</sup>	2009
MBT, DBT, TBT, MPhT, DPhT	Orina	SPME: 100 µm PDMS, 15 min, HS	GC-MIP-AED	10 -50	Zachariadis <sup>120</sup>	2009
FBTO	Suelos agrícolas	PLE, etilación	GC-AED	2000* <sup>b</sup>	Canosa <sup>121</sup>	2009
MMT, DMT, TMT	Agua de mar	-	LC-HG-ICP-MS	39-266	Zhai <sup>122</sup>	2009
MBT, DBT, TBT (y especies de Hg)	Agua superficial, sedimento y tejido biológico	UAE o filtración, etilación, HS-SBSE	TD-GC-MS	0.16- 0.8 (agua) 5.5-16* (resto)	Prieto <sup>123</sup>	2008
MBT, DBT, TBT	Sedimento, agua de mar, marisco	UAE (excepto agua), HS-SDME, derivatización	GC-ICP-MS	0.8-1.8	Xiao <sup>124</sup>	2008
MBT, DBT, TBT, MPhT, DPhT, TPhT	Agua	Etilación, DLME	GC-FPD	0.2-10	Birjandi <sup>110</sup>	2008
MBT, DBT, TBT, MPhT, DPhT, MOcT	Coñac, vino	SPME: 100 µm PDMS, 30 min, HS	GC-PFPD	1.2 - 52	Heroult <sup>125</sup>	2008

<sup>a</sup> Expresado en ng L<sup>-1</sup> (como Sn), excepto en los marcados con asterisco (\*) que se expresan como ng kg<sup>-1</sup> (como Sn).

<sup>b</sup> Límite de cuantificación en ng L<sup>-1</sup> (como Sn)

Tabla 3.3. (Cont.) Características de métodos analíticos recientes (2000-2010) para la especiación de estaño.

Especies	Matriz	Tratamiento de muestra	Técnica	LOD <sup>a</sup>	Autor	Año
MBT, DBT, TBT, MPHT, DPhT, TPhT (y especies de Hg)	Sedimento, tejido biológico	SPME: 30 µm PDMS, 18 min, HS	GC-MIP- AED	26 - 146	Delgado <sup>126</sup>	2008
TBT; TPhT, TET	Textil, plástico	MAE	LC-ESI- MS	146 - 11530	Wang <sup>127</sup>	2008
MBT, DBT, TBT, MMT, DMT, TMT, DET, MET	Lixiviado, biogas	Pre-concentración criogénica, dopaje (ID), MAE, alquilación	CT-GC- ICP-MS	10 - 40	Pinel- Raffaitin <sup>128</sup>	2008
MBT, DBT, TBT	Material biológico criogenizado	Dopaje (ID), MAE o UAE, etilación	GC-ICP- MS	1 - 450*	Point <sup>129</sup>	2007
MBT, DBT, TBT	Agua mar, sedimento, tejido biológico	Digestión por microondas, LLE en baño termostatizado, etilación	GC-ICP- MS	0.02 - 0.1*	Úveges <sup>130</sup>	2007
MBT, DBT, TBT, MPHT, DPhT, TPhT	Músculo de pescado	Digestión básica, etilación	GC-FPD	20000 - 150000	Tang <sup>131</sup>	2007
TET, TrET, TBT, TPhT, TrPhT	Harina	Digestión por microondas	LC-UV	45000 - 160000	Wang <sup>132</sup>	2006
MBT, DBT, TBT	Agua mar	LLE, etilación	GC-ICP- MS	-	Rodriguez- Gonzalez <sup>133</sup>	2006
MBT, DBT, TBT	Mejillón, ostra, sedimento marino	UPE, MISPE	GC-FPD	1090 - 1260*	Gallego- Gallegos <sup>108</sup>	2006
DMT, TBT, DBT	Agua	SPME: 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 40 min, HS	GC-ICP- MS	0.2 - 8	Bianchi <sup>46</sup>	2006
DBT, TBT	Sedimento, agua	UAE, SPE, HG	GC-MS	3280 - 47000	Serra <sup>134</sup>	2005
MBT, DBT, TBT, MPHT, DPhT, MOcT, DOcT, TOcT	Sedimento marino, mejillón, agua	SLE, etilación, LLE o SPME: 75 µm CAR/PDMS, 40 min, HS	GC- PFPD	0.007 - 0.5	Mzoughi <sup>135</sup>	2005

<sup>a</sup> Expresado en ng L<sup>-1</sup> (como Sn), excepto en los marcados con asterisco (\*) que se expresan como ng kg<sup>-1</sup> (como Sn).



Tabla 3.3. (Cont.) Características de métodos analíticos recientes (2000-2010) para la especiación de estaño.

Especies	Matriz	Tratamiento de muestra	Técnica	LOD <sup>a</sup>	Autor	Año
MBT, DBT, TBT, MPhT, DPhT, TPhT	Sedimento	UAE, pentilación, <i>clean-up</i>	GC-FPD	1260 – 2700*	Fernandez <sup>136</sup>	2005
MBT, DBT, TBT, MPhT, DPhT, TPhT	Agua de río, sedimento de puerto	SPME: 100 µm PDMS, 30 min, HS	RTL-GC- MS	0.4 – 1.1 (Agua) 0.3 – 1.9 (Sedim.)	Devos <sup>137</sup>	2005
DMT, TrMT, MBT, DBT, TBT, DPhT	Agua, sedimento marino	UPE, etilación	GC-AED	11 - 50	Campillo <sup>138</sup>	2004
MBT, DBT, TBT, TPhT	Agua	SLM, etilación	GC-FID	160 - 630	Cukrowska <sup>139</sup>	2004
MMT, DMT, TMT, MBT, DBT, TBT, MOcT, DOcT	Aguas de lluvia	LLE, etilación, <i>clean-up</i>	GC-ICP- MS	-	Huang <sup>140</sup>	2004
MBT, DBT, TBT, TrBT	Corcho, vino	SLE y propilación (corcho); HG y SPME (vino): 100 µm PDMS, 20 min, HS	GC-QSIL- FDP y GC- MS	1800 – 2900*	Jiang <sup>141</sup>	2004
MBT, DBT, TBT	Sedimento marino	UAE, SPE, propilación	GC-MS	70 - 100	Muñoz <sup>142</sup>	2004
DBT, TPhT	Agua, pescado	SPE (agua) UAE (pescado)	µ-LC-ESI- ITMS	380 - 580	Jones-Lepp <sup>143</sup>	2004
Sn inorgánico, MBT, DBT, TBT, MPhT, DPhT	Mejillón fresco y enlatado	UAE	LC-HG- AAS	2820 – 16740	Viñas <sup>144</sup>	2004
TMT, DMT, MMT, MBT, DBT, TBT (y especies de Hg)	Material biológico	SPME: 65 µm PDMS/DVB, 12 min, HS	MCGC- ICP- TOFMS	0.09 – 0.99*	Jitaru <sup>145</sup>	2004
TBT	Sedimento	Dopaje (ID), ASE	LC-ICP- MS GC-ICP- MS	150 15	Wahlen <sup>88</sup>	2003

<sup>a</sup> Expresado en ng L<sup>-1</sup> (como Sn), excepto en los marcados con asterisco (\*) que se expresan como ng kg<sup>-1</sup> (como Sn).

Tabla 3.3. (Cont.) Características de métodos analíticos recientes (2000-2010) para la especiación de estaño.

Especies	Matriz	Tratamiento de muestra	Técnica	LOD <sup>a</sup>	Autor	Año
MBT, DBT, TBT (y especies de Hg y Pb)	Aguas naturales	SPME: 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 30 min, HS	GC-MS	0.59 -6.1	Centineo <sup>146</sup>	2004
MMT, DMT, TMT, TrMT, TPrT, MBT, DBT, TBT, TrBT, MPhT, DPhT, TPhT, MOcT, DOcT, TOcT	Agua, pescado	SPME: 75 mm, CAR- PDMS, 30 min, HS; etilación	GC-PFPD	0.01 - 56	Le Gac <sup>147</sup>	2003
DBT, TBT, TPhT	Sedimento	ASE o MAE	LC-ICP-MS	40 (TBT)	Wahlen <sup>148</sup>	2003
MBT, DBT, TBT	Sedimento	SPME: 100 µm PDMS, 15 min, HS	ID-GC-MS	0.2 - 0.3	Bancon-Montigny <sup>116</sup>	2002
MBT, DBT, TBT, MPhT, DPhT, TPhT	Sedimento	SPME: 100 µm PDMS, 40 min, HS	GC-FPD GC-MIP-AES GC-PFPD GC-ICP-MS	0.006 - 0.583 0.009 - 0.415 0.001 - 0.200 0.0006 - 0.02	Aguerre <sup>45</sup>	2001
TBT	Sedimento	SPME: Supel-Q PLOT <i>in-tube</i> SPME, 15 ciclos	LC-ESI-MS	50	Wu <sup>112</sup>	2001
TBT	Agua	SPME: 65 µm PDMS/DVB, 4 min, HS	ICP-MS	5.8	Mester <sup>114</sup>	2001
MBT, DBT, TBT, MPhT, DPhT, TPhT	Mejillón, ostra	SLE, SPE	LC-Fluorométrica	3000 - 140000*	González-Toledo <sup>149</sup>	2001
MBT, DBT, TBT, MPhT, DPhT, TPhT	Sedimento	PLE	LC-ICP-MS	700 - 2000*	Chiron <sup>150</sup>	2000
MBT, DBT, TBT	Agua de mar	SPME: PDMS, 20 min, HS	GC-QSIL-FPD	6.8 - 11.1	Jiang <sup>151</sup>	2000
MBT, DBT, TBT	Sedimento	SPME: 100 µm PDMS, 60 min, HS	GC-FID	900 - 1200	Millan <sup>152</sup>	2000

<sup>a</sup> Expresado en ng L<sup>-1</sup> (como Sn), excepto en los marcados con asterisco (\*) que se expresan como ng kg<sup>-1</sup> (como Sn).

Las matrices principalmente estudiadas han sido agua de mar, sedimentos y muestras biológicas (tejidos de organismos marinos). Sin embargo, no existen materiales certificados de referencia (CRMs) de muestras acuosas, sólo se suministran de sedimentos y tejidos biológicos. En la Tabla 3.4 se recoge una lista de los materiales de referencia disponibles para la determinación de OTCs.

Tabla 3.4. Materiales de referencia certificados para especies organoestánicas.

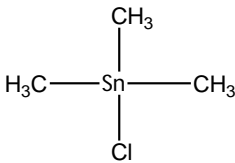
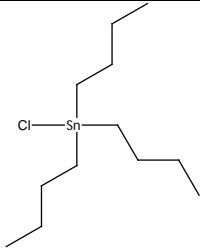
Nombre	Proveedor	Matriz	Valores certificados <sup>a</sup>	
PACS-2	NRCC	Sedimento de puerto marino	DBT <sup>b</sup> : 1047 ± 64 ng g <sup>-1</sup> TBT <sup>b</sup> : 890 ± 105 ng g <sup>-1</sup>	
HIPA-1	NRCC	Sedimento de puerto marino mezclado	TBT <sup>b</sup> : 78 ± 9 ng g <sup>-1</sup>	
SOPH-1	NRCC	Sedimento de puerto marino mezclado	DBT <sup>b</sup> : 174 ± 9 ng g <sup>-1</sup> TBT <sup>b</sup> : 125 ± 7 ng g <sup>-1</sup>	
462	BCR	Sedimento costero	DBT: 68 ± 12 µg kg <sup>-1</sup> TBT: 54 ± 15 µg kg <sup>-1</sup>	
646	BCR	Sedimento de agua dulce	MBT: 610 ± 120 µg kg <sup>-1</sup> DBT: 770 ± 90 µg kg <sup>-1</sup> TBT: 480 ± 80 µg kg <sup>-1</sup>	MPhT: 69 ± 18 µg kg <sup>-1</sup> DPhT: 36 ± 8 µg kg <sup>-1</sup> TPhT: 29 ± 11 µg kg <sup>-1</sup>
477	BCR	Tejido de mejillón	MBT: 1.50 ± 0.28 mg kg <sup>-1</sup> DBT: 1.54 ± 0.12 mg kg <sup>-1</sup> TBT: 2.20 ± 0.19 mg kg <sup>-1</sup>	
710	BCR	Tejido de ostra	MBT: 50.0 ± 14.0 µg kg <sup>-1</sup> DBT: 82.0 ± 15 µg kg <sup>-1</sup> TBT: 133.0 ± 19 µg kg <sup>-1</sup>	
CRM 11	NIES	Tejido de pescado	TBT: 1.3 ± 0.1 µg g <sup>-1</sup> TPhT <sup>c</sup> : 6.3 µg g <sup>-1</sup>	
CRM 12	NIES	Sedimento marino	TBT: 0.19 ± 0.03 mg kg <sup>-1</sup>	
CRM 7306-a	NMIJ	Sedimento marino	TBT <sup>b</sup> : 44 ± 3 µg kg <sup>-1</sup> DBT <sup>b</sup> : 51 ± 2 µg kg <sup>-1</sup> MBT <sup>b</sup> : 67 ± 3 µg kg <sup>-1</sup>	TPhT <sup>b</sup> : 6.9 ± 1.2 µg kg <sup>-1</sup> DPhT <sup>b</sup> : 3.4 ± 0.5 µg kg <sup>-1</sup>

<sup>a</sup>: Como catión, excepto cuando se indica. <sup>b</sup>: Como estaño elemental. <sup>c</sup>: Valor indicativo.

### 3.1.5. Características de los OTCs objeto de estudio

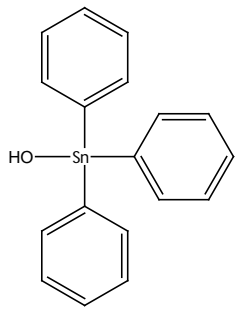
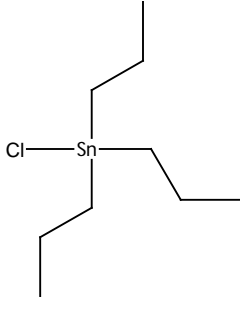
Para el presente trabajo se han seleccionado cuatro OTCs trisustituidos: cloruro de trimetilestano (TMT), cloruro de tributilestano (TBT), hidroxido de trifenilestano (TPhT) y cloruro de tripropilestano (TPrT). La selección se debe a que, como se ha mencionado, las especies triorganoestánicas son las más tóxicas y las más perjudiciales para el medio ambiente. A continuación se resumen las características principales de los OTCs objeto de estudio (Tabla 3.5)<sup>5</sup>.

Tabla 3.5. Características principales de los OTCs objeto de estudio.

NOMBRE	Cloruro de trimetilestano (TMT)	Cloruro de tributilestano (TBT)
ESTRUCTURA MOLECULAR		
Nº CAS	1066-45-1	1461-22-9
CÓDIGO EPA	600007	083107
FORMULA EMPÍRICA	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> Cl Sn	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> Cl Sn
PESO MOLECULAR	199.26 g mol <sup>-1</sup>	325.49 g mol <sup>-1</sup>
TIPO DE USO	Precursor de compuestos estabilizantes de PVC	Aditivo en pinturas anti-incrustantes, microbicida
DATOS FÍSICO-QUÍMICOS	Punto fusión = 38.5 °C Punto de ebullición: 148 °C (a 12 Torr) Solubilidad (T <sup>a</sup> ambiente): soluble en disolventes orgánicos pK <sub>a</sub> <sup>*</sup> : 6.6 <sup>153</sup>	Densidad: 1.2 g cm <sup>3</sup> (a 25 °C) Punto fusión = -9 °C Punto de ebullición: 171-173 °C (a 25 Torr) Solubilidad (T <sup>a</sup> ambiente): prácticamente insoluble en agua; soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos pK <sub>a</sub> <sup>*</sup> : 6.25 <sup>154, 155</sup>

\* Valores de pK<sub>a</sub> de los cationes TMT<sup>+</sup>, TBT<sup>+</sup>.

Tabla 3.5 (Cont.). Características principales de los OTCs objeto de estudio.

NOMBRE	Hidroxido de trifenilestano (TPhT)	Cloruro de tripropilestano (TPrT)
ESTRUCTURA MOLECULAR		
Nº CAS	76-87-9	2279-76-7
CÓDIGO EPA	083601	-
FORMULA EMPÍRICA	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O Sn	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> Cl Sn
PESO MOLECULAR	367.03	283.43
TIPO DE USO	Fungicida, molusquicida y herbicida	Agente biocida en pinturas anti-incrustantes
DATOS FÍSICO-QUÍMICOS	Densidad: 1.54 g cm <sup>3</sup> (a 20 °C) Punto fusión = 118-120 °C Punto de ebullición: - Solubilidad (T <sup>a</sup> ambiente): prácticamente insoluble en agua; soluble en disolventes orgánicos pK <sub>a</sub> *: 5.20 <sup>154</sup>	Punto fusión = -23.5 °C Punto de ebullición: 240 °C (a 13.5 Torr). Solubilidad (T <sup>a</sup> ambiente): prácticamente insoluble en agua; fácilmente soluble en disolventes orgánicos. pK <sub>a</sub> *: 6.3 <sup>155</sup>

\* Valores de pK<sub>a</sub> de los cationes TPhT<sup>+</sup>, TPrT<sup>+</sup>.

## 3.2. Planteamiento del problema

La elevada toxicidad de los OTCs, y más concretamente de las especies organoestánicas trisustituidas, hace que su análisis y monitorización sean de extrema importancia. La monitorización de especies elementales requiere métodos analíticos selectivos y sensibles capaces de resolver y cuantificar las diferentes especies a muy bajos niveles de concentración.

Como se ha visto, entre las numerosas metodologías analíticas que la literatura recoge para llevar a cabo estudios de especiación de estaño, destacan las basadas en el acoplamiento de la cromatografía de gases con diferentes detectores moleculares o elementales. Los métodos basados en la cromatografía líquida son menos abundantes.

En este contexto, el presente estudio plantea llevar a cabo un original acoplamiento instrumental, basado en la microextracción en fase sólida (SPME) acoplada en línea a cromatografía líquida (LC) con ICP-MS como detector. Se pretende así desarrollar una nueva metodología analítica que permita el estudio de la presencia de residuos de los compuestos OTCs trisustituidos trimetilestaño (TMT), trifenilestaño (TPhT), tripropilestaño (TPrT) y tributilestaño (TBT) en muestras de agua, tanto dulce como marina.

## 3.3. Material y equipamiento

### 3.3.1. Equipamiento

Las características del equipamiento utilizado en el desarrollo del método analítico SPME/LC-ICP-MS se detallan a continuación.

En la separación cromatográfica se ha utilizado un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), provisto de una bomba modelo 1100 con una válvula de inyección Rheodyne modelo 7725i (Cotati, CA, USA) con un bucle de inyección de 10  $\mu$ L.

El ICP-MS utilizado en el presente trabajo, modelo 7500ce de Agilent Technologies, está equipado con un nebulizador concéntrico MicroMist de Glass Expansion (Melbourne Oeste, Victoria, Australia). Este tipo de nebulizador ofrece un alto rendimiento en términos de buena precisión, señal estable, bajas desviaciones estándar y rápida limpieza entre muestras. La antorcha utilizada es de tipo Fassel, con un diámetro interno de 1.5 mm. Este tipo de antorchas, con diámetro interno inferior al convencional (2.5 mm), se utilizan cuando se introducen al plasma disolventes orgánicos, ya que reducen la carga del plasma y mejoran la estabilidad. El software utilizado, ICP-MS ChemStation System G1834B, es la revisión B.03.02. Los picos cromatográficos fueron integrados utilizando el software para cromatografía de plasma de Agilent Technologies (Agilent Technologies ICP-MS Plasma Chromatographic Software).

La conexión de la salida de la columna cromatográfica al nebulizador del ICP-MS se ha llevado a cabo mediante un capilar de PEEK de 22 cm de longitud y 0.25 mm de diámetro interno.

Las columnas cromatográficas empleadas en este estudio han sido: Mediterranea Sea18 (100 x 2.1 mm D.I., 3  $\mu\text{m}$ ) y Tracer Extrasil NH<sub>2</sub> (150 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) de Teknokroma (Barcelona, España); Zorbax Plus C18 (50 x 4.6 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ), Zorbax SB-C18 (30 x 2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ), Zorbax Eclipse XDB C8 (150 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) y Zorbax SB-CN (100 x 2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) suministradas por Agilent Technologies.

La interfase comercial para SPME/LC (Supelco, Bellefonte, PA, USA) consiste en una válvula Rheodyne estándar de seis puertos equipada con una cámara de desorción de 60  $\mu\text{L}$ . Para la extracción de los analitos se probaron cuatro tipos de fibras: Polidimetilsiloxano 100  $\mu\text{m}$  (PDMS), Poliacrilato 85  $\mu\text{m}$  (PA), Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno 60  $\mu\text{m}$  (PDMS/DVB) y Carbowax/Templated Resin 50  $\mu\text{m}$  (CW/TPR), todas comercializadas por Supelco. Los viales (4 mL) utilizados en la etapa de extracción con cápsulas de sellado y septa de PTFE fueron proporcionados por Kimble Glass (Vineland, NJ, USA). La agitación de las muestras se llevó a cabo en una placa de agitación magnética de IKA (Staufen, Alemania) con imanes de 0.8 x 0.3 cm D.I.

Para el ajuste y medida del pH, se empleó un pH-metro modelo GLP21 equipado con un electrodo de 3 mm de diámetro modelo 58-02 y sonda de temperatura de Crison Instruments, S.A. (Alella, Barcelona, España).

La fase móvil fue desgaseada en un sistema de ultrasonidos Selecta (Barcelona, España).

### 3.3.2. Reactivos y disolventes

Para el ajuste diario de las condiciones del ICP-MS se utilizó una disolución de 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Li, Mg, Co, Y, Ce y Tl en ácido nítrico al 2% suministrada por Agilent Technologies.



En el estudio de las fases móviles el acetonitrilo y el metanol, de calidad para HPLC, fueron proporcionados por Scharlab (Barcelona, España). El ácido acético glacial (Suprapur) fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania). Los pares iónicos ensayados en la fase móvil fueron trietilamina (99.5%), ácido octanosulfónico (98%), ambos de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), y cloruro de tetrametilamonio (98%) de Merck.

El agua fue obtenida por un sistema de filtración Milli-Q de Millipore (Milford, MA, USA) purificando agua previamente desmineralizada mediante ósmosis inversa en un sistema Milli-Ro Plus de Millipore. El agua se almacenó en un bidón de polietileno de alta densidad para evitar la posible contaminación por cationes metálicos procedentes del vidrio.

Todos los disolventes fueron filtrados a través de membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  tipo GVWP de polivinilideno fluorado (PVDF) proporcionadas por Millipore.

En la etapa de microextracción se utilizó cloruro sódico (Scharlab) para proporcionar la adecuada fuerza iónica y acetato de sodio (99% de pureza), fosfato disódico (99.5%), dihidrógeno fosfato de sodio (99%), hidróxido de amonio (25%) y cloruro amónico (99.8%) para el ajuste del pH, todos comercializados por Merck.

Los patrones de los OTCs, cloruro de trimetilestaño (TMT), cloruro de tripropilestaño (TPrT), hidróxido de trifenilestaño (TPhT) y cloruro tributilestaño (TBT) fueron suministrados por el Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburgo, Alemania), con purezas certificadas de 98.5%, 97%, 96% y 96.5% respectivamente.

Las muestras de agua se tomaron en el puerto deportivo del Club Náutico Aldayeta en el embalse de Ullibarri- Gamboa (Álava) y en el puerto de Bermeo (Vizcaya), se filtraron por filtros de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  (Scharlab) y se almacenaron a - 42 °C en oscuridad hasta su análisis.

### 3.3.3. Preparación de disoluciones patrón

Los patrones puros de los cuatro organoestánicos fueron utilizados para preparar disoluciones madre individuales de 1000 mg L<sup>-1</sup> (excepto para el TPhT, que fue de 500 mg L<sup>-1</sup>) en metanol y fueron almacenadas a -42 °C. A partir de las disoluciones madre, semanalmente, por dilución en metanol se preparó un patrón conjunto conteniendo 1 mg L<sup>-1</sup> de cada analito.

A partir del patrón conjunto, se prepararon diariamente las diluciones de trabajo en agua a la concentración requerida para la optimización de la etapa de extracción o el calibrado. Para la calibración del método se utilizaron patrones de concentraciones comprendidas entre 0.3 y 20 µg L<sup>-1</sup> (como Sn) de los cuatro OTCs objeto de estudio. Tanto el patrón conjunto de los cuatro analitos, como las diluciones de trabajo y los patrones de calibración fueron almacenados en refrigeración a 4 °C.

Las muestras de agua dopadas fueron preparadas mediante la adición de una cantidad apropiada de disolución patrón de los OTCs objeto de estudio a muestras de agua dulce y marina libres de OTCs.

### 3.3.4. Limpieza del material

Todo el material de laboratorio se limpió a fondo con el objetivo de minimizar la contaminación. Para ello, en primer lugar se sumergió durante 2-3 días en un baño de ácido nítrico al 15 % y después se aclaró con agua Milli-Q cinco veces. Tras la limpieza, una vez que el material se secó, se guardó en bolsas de plástico dobles hasta su utilización.

## 3.4. Desarrollo de un método analítico LC-ICP-MS

En este apartado se describe lo relativo al desarrollo experimental del método basado en el acoplamiento de cromatografía líquida e ICP-MS. En él se describe la selección de las diferentes variables cromatográficas (columna, fase móvil y flujo), las condiciones de operación del ICP-MS, así como un estudio preliminar de reproducibilidad.

### 3.4.1. Estudio de las variables cromatográficas de separación

Las variables cromatográficas que determinan la separación de los distintos analitos de una muestra por LC son fundamentalmente el tipo de columna, la composición de la fase móvil y el caudal de la misma. Así, para el desarrollo del método analítico LC/ICP-MS, se ha estudiado la influencia de cada una de estas variables en la separación de los analitos objeto de estudio.

#### 3.4.1.1. Selección de la columna cromatográfica

A pesar de que los OTCs objeto de estudio presentan algunas diferencias en su polaridad, todos ellos se disuelven con dificultad en agua. Es decir, son compuestos que poseen una polaridad moderada, por lo que se optó por la cromatografía en fase reversa que es la más adecuada para la separación de este tipo de compuestos. En este tipo de cromatografía, considerada en la actualidad como la más habitual, la fase estacionaria es de carácter no-polar y la fase móvil está constituida por disolventes polares.

Con el fin de obtener una adecuada separación cromatográfica de los OTCs a analizar, se realizaron ensayos con columnas de diferentes características. En la Tabla 3.6 se

presentan las características y aplicaciones de los diferentes tipos de columnas ensayadas.

Tabla 3.6. Tipos de columnas cromatográficas.

Tipo de relleno	Aplicaciones
NH <sub>2</sub>	Aplicaciones en cromatografía de fase normal, de intercambio iónico y fase reversa de compuestos polares.
CN	Útil en cromatografía de fase normal y reversa de compuestos de elevado peso molecular, como las proteínas.
C8	Útil en fase reversa y de intercambio iónico. Compuestos de polaridad media y elevada.
C18	Útil en fase reversa y de intercambio iónico. Compuestos apolares o moderadamente polares.

Estudios iniciales realizados con las columnas Zorbax SB-CN (100 x 2,1 mm, 3.5  $\mu$ m), Tracer Extrasil NH<sub>2</sub> (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) y Zorbax Eclipse XDB C8 (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) empleando diversas fases móviles de distinta composición no permitieron obtener una buena separación cromatográfica. Por un lado, con la columna CN se obtuvieron bajas resoluciones ( $R_s < 0.8$ , en el mejor de los casos), mientras que con las columnas NH<sub>2</sub> y C8, para tiempos de análisis razonables, se observó una coelución de los compuestos.

Por el contrario, los resultados inicialmente obtenidos con el relleno del tipo C18 fueron más satisfactorios, indicando la posibilidad de obtener una correcta separación cromatográfica de los OTCs. Esto puede ser debido a que las columnas C18 tienen rellenos de sílica químicamente modificados que incorporan grupos *n-octadecilo*. Estos rellenos son altamente selectivos y eficaces, presentan tiempos de equilibrio pequeños y permiten utilizar fases acuoso-orgánicas polares que disuelven la mayor parte de las sustancias, al tiempo que gozan de una buena garantía de reproducibilidad.

Por ello, se probaron varias columnas C18 de longitud, diámetro interno y tamaño de partícula diferente con diferentes fases móviles. Los resultados obtenidos con las mismas se recogen en la Tabla 3.7 que se muestra a continuación:

Tabla 3.7. Resultados de los ensayos realizados con las columnas C18.

Columna	Resultado
Mediterranea Sea18 de 100 x 2.1 mm D.I., 3 $\mu\text{m}$ de tamaño de partícula	Separación de los 4 analitos en un tiempo de análisis razonable
Zorbax Plus C18 50 x 4.6 mm D.I., 1.8 $\mu\text{m}$ de tamaño de partícula	Inadecuada separación de los analitos en un tiempo de análisis razonable
Zorbax SB-C18 de 30 x 2.1 mm D.I. y de 3.5 $\mu\text{m}$ de tamaño de partícula	Separación de los 4 analitos en un tiempo de análisis razonable

Como queda reflejado en la tabla, las columnas Mediterranea Sea18 (100 x 2.1 mm D.I., 3  $\mu\text{m}$ ) y Zorbax SB-C18 (30 x 2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) dieron buenos resultados. Como ya se ha mencionado, el objetivo principal de este estudio fue el acoplamiento de la SPME a LC-ICP-MS. Para ello es necesario sustituir el puerto de inyección del sistema cromatográfico por una interfase comercial SPME/LC que posee una cámara de desorción de 60  $\mu\text{L}$ . Dado que el volumen de inyección recomendado por el fabricante para la columna Zorbax SB-C18 (30 x 2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) es de 1  $\mu\text{L}$ , muy por debajo de los 60  $\mu\text{L}$  de la cámara de desorción, se seleccionó la columna Mediterranea Sea18 de 100 x 2.1 mm D.I. y 3  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula de Teknokroma. Se trata de una columna ultrarrápida, que por sus dimensiones y tamaño de partícula resulta muy adecuada para LC-ICP-MS y cuyas velocidades de flujo recomendadas se encuentran entre 0.2 y 0.5  $\text{mL min}^{-1}$ .

Las columnas Mediterranea Sea18 cuentan con un relleno de sílice de extrema pureza con contenidos de metales inusualmente bajos. Las partículas de sílice son perfectamente esféricas, rígidas e inertes. La estructura de poro está, además, muy definida y es muy uniforme, garantizando la máxima velocidad de transferencia de los solutos entre la fase estacionaria y la fase móvil, dando lugar a mayores eficacias de

separación. La química del relleno hace que estas columnas sean resistentes a valores extremos de pH, pudiéndose trabajar con eluyentes a pH entre 1 y 12.

### 3.4.1.2. Estudio de la composición de la fase móvil

El estudio de la composición de la fase móvil más adecuada para llevar a cabo la separación isocrática de los cuatro OTCs se realizó fijando ciertas variables cromatográficas y de detección que se recogen en la Tabla 3.8. Como se ha comentado, el modo de trabajo en gradiente puede causar problemas al utilizar un ICP-MS como detector, por lo que las separaciones isocráticas son más aconsejables.

Tabla 3.8. Variables cromatográficas y de detección para el estudio de la composición de la fase móvil.

Variables cromatográficas	Columna	Mediterranea Sea18 de 100 x 2.1 mm D.I., 3 $\mu$ m
	Flujo de fase móvil	0.3 mL min <sup>-1</sup>
	Temperatura de trabajo	Temperatura ambiente
	Volumen de inyección	10 $\mu$ L
Variables de detección	Tiempo de integración por masa	300 ms
	Isótopos monitorizados	<sup>118</sup> Sn, <sup>120</sup> Sn y <sup>103</sup> Rh

El estudio de la composición de la fase móvil se llevó a cabo utilizando distintas fases móviles consistentes en mezclas de agua-metanol y agua-acetonitrilo con diferentes porcentaje de ácido acético y pares iónicos. La utilización de ácido acético en la separación de OTCs por cromatografía líquida es algo que la bibliografía recoge sistemáticamente. El ácido acético en la fase móvil puede reducir la adsorción de las especies que contienen estaño en la columna favoreciendo su elución<sup>156</sup>. Los pares iónicos ensayados fueron: trietilamina (TEA), ácido octanosulfónico (OSF) y cloruro de tetrametilamonio (TMACl). A todas las fases móviles se les añadió rodio (Rh) en una concentración de 1  $\mu$ g L<sup>-1</sup> para llevar a cabo la optimización final de las condiciones del ICP-MS una vez acoplada la LC. Como se verá, esta optimización final es importante para asegurar la estabilidad del plasma con las condiciones de la fase móvil orgánica.

Los ensayos llevados a cabo permitieron realizar las siguientes observaciones:

- Se observó que para concentraciones de ácido acético por debajo del 7 % se obtenían separaciones de más baja resolución, mientras que un aumento de la concentración de ácido acético reducía los tiempos de retención, mejorando la resolución. En la Figura 3.3 se ha representado la resolución ( $R_s$ ) de cada pico cromatográfico respecto al anterior con la variación del porcentaje de ácido acético de la fase móvil. Como puede observarse, con un 10 % de ácido acético fue posible la separación de los analitos, mientras que con concentraciones menores se daba una coelución de TBT y TPhT. El 10 % de ácido acético resultó ser el más adecuado, lo que se corresponde con un pH en la fase móvil de torno a 1.9, dentro del intervalo de pHs recomendado por el fabricante de la columna.

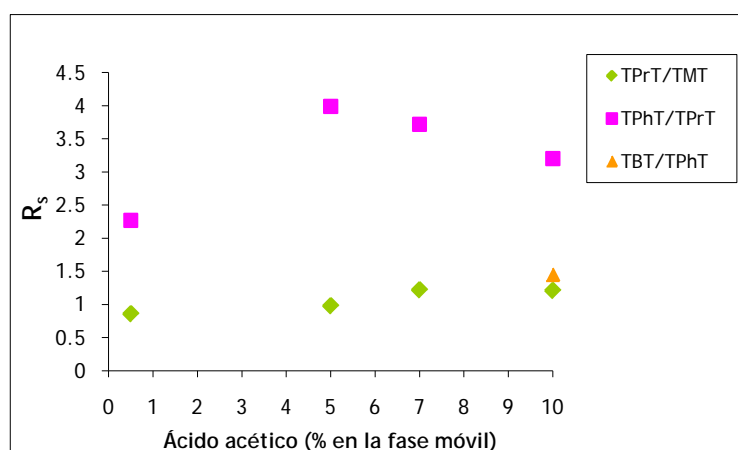


Figura 3.3. Resolución entre picos cromatográficos en función del porcentaje de ácido acético de la fase móvil.

- La adición de los tres pares iónicos ensayados a la fase móvil no mejoró la resolución de los picos de forma significativa. En consecuencia, y teniendo en cuenta que la introducción de sales resulta inadecuada para el ICP-MS<sup>1</sup>, los pares iónicos se omitieron de la fase móvil.
- El uso de acetonitrilo proporcionó picos más estrechos que el metanol. Aunque, como se ha comentado, el acetonitrilo es más incompatible con el ICP-MS que el metanol, la introducción de oxígeno permitió trabajar con altas concentraciones

de acetonitrilo sin comprometer el rendimiento del instrumento obteniéndose suficiente estabilidad del plasma. Con un 40% de acetonitrilo se consiguió una buena separación cromatográfica de los cuatro analitos en un tiempo de análisis relativamente corto (~12 min); con porcentajes mayores se producían solapamientos de los picos cromatográficos.

Por todo esto, se seleccionó como más adecuada la fase móvil compuesta por agua:acetonitrilo:ácido acético (50:40:10). La introducción de esta fase móvil al ICP-MS exigió la introducción de oxígeno mediante un controlador de flujo másico adicional para evitar que el plasma se apagase y garantizar la estabilidad de la señal.

#### 3.4.1.3. Selección del flujo de la fase móvil

Para finalizar el estudio de las variables cromatográficas que condicionan la separación se estudió la influencia del flujo de la fase móvil. Dadas las características de la columna cromatográfica empleada, se estudiaron flujos de fase móvil entre 0.2 y 0.5 mL min<sup>-1</sup>.

Se comprobó experimentalmente que para flujos de 0.2 mL min<sup>-1</sup> se obtenían picos muy anchos en su base que no proporcionaban una buena resolución, observándose un aumento de los tiempos de retención y como consecuencia del tiempo de análisis. Por el contrario, para flujos de 0.3 mL min<sup>-1</sup> se obtuvieron picos más estrechos y menos dispersos. Se observó que a flujos mayores se daba un solapamiento de los picos cromatográficos. Por lo tanto se optó por un flujo de fase móvil de 0.3 mL min<sup>-1</sup>, ya que la resolución de los picos era buena y el tiempo de análisis no superaba los 12 min. La utilización de este flujo no supone ningún problema, ya que pueden utilizarse flujos de muestra pequeños sin comprometer la sensibilidad del ICP-MS, a la vez que se reduce la carga de disolvente al plasma. Además, este flujo encaja bien con el nivel óptimo de aspiración del nebulizador MicroMist (entre 0.3 y 0.6 mL min<sup>-1</sup>).

Las principales características de la separación cromatográfica (tiempos de retención y resolución) en las condiciones cromatográficas seleccionadas se recogen en la Tabla 3.9.



Tabla 3.9. Características de la separación cromatográfica. Columna: Mediterranea Sea18 (100 x 2.1 mm, 3  $\mu$ m); fase móvil: agua:acetonitrilo:ácido acético (50:40:10); flujo: 0.3 mL min<sup>-1</sup>.

Analito	t <sub>r</sub> (min)	R <sub>s</sub> (respecto al pico anterior)
TMT	0.764	-
TPrT	2.335	2.6
TPhT	7.349	5.0
TBT	9.889	2.1

### 3.4.2. Estudio de las condiciones de operación del ICP-MS

El rendimiento de un ICP-MS depende fuertemente de las condiciones de operación. El acoplamiento de LC en fase reversa a ICP-MS precisa de una serie de cambios respecto a las condiciones de operación habituales en ICP-MS, muchos de los cuales se han comentado en la introducción del presente capítulo.

Por un lado, para reducir la carga de disolventes orgánicos en el plasma, la cámara de nebulización de doble paso fue refrigerada a -5 °C. También se adicionó oxígeno (a un flujo de 0.1 L min<sup>-1</sup>) tras la nebulización mediante un controlador de flujo másico adicional con el fin de convertir el carbono orgánico a CO<sub>2</sub> en el plasma, evitando así la formación de depósitos de carbono en los conos. Para la selección del caudal de oxígeno se consideró la estabilidad en el tiempo de la señal del Rh añadido a la fase móvil. A caudales más bajos de oxígeno, si bien el plasma no se apagaba, la señal (cuentas) de <sup>103</sup>Rh iba disminuyendo a lo largo del tiempo. Se comprobó que la introducción de oxígeno a 0.1 L min<sup>-1</sup> garantizaba unas condiciones de plasma estable, lo que se reflejaba en una señal constante de <sup>103</sup>Rh a lo largo del tiempo.

Asimismo, los conos de Ni utilizados habitualmente fueron sustituidos por conos de platino más robustos. La antorcha convencional, de 2.5 mm de diámetro interno, fue reemplazada por otra de diámetro interno inferior (1.5 mm) diseñada para análisis con disolventes orgánicos. La potencia de radiofrecuencia del plasma se aumentó ligeramente, de los 1500 W habituales a 1550 W, para reducir, como se ha comentado, los efectos negativos del aumento de la carga al plasma.

En cuanto al nebulizador, no fue necesaria su sustitución. El uso óptimo del nebulizador micro-concéntrico MicroMist, con el que habitualmente opera el equipo con el que se ha llevado a cabo este trabajo, se sitúa en un caudal líquido comprendido entre 0.3 y 0.6 mL min<sup>-1</sup>, rango compatible con el rango de flujo óptimo de la columna cromatográfica empleada (0.2 - 0.5 mL min<sup>-1</sup>) y con los flujos óptimos del resto de columnas ensayadas. La compatibilidad de ambos flujos es crítica, ya que a este rango de flujos el nebulizador produce una mayor proporción de gotas finas en el aerosol que son más eficientemente transportadas en la cámara de nebulización y atomizadas e ionizadas en el plasma.

La conexión de la salida de la columna cromatográfica al nebulizador del ICP-MS se llevó a cabo mediante un capilar de PEEK cuya longitud y diámetro interno se minimizaron al máximo (22 cm y 0.25 mm, respectivamente), ya que el volumen interno del capilar se mostró clave a la hora de obtener una buena resolución de los picos cromatográficos.

Para la selección de los isótopos a monitorizar se tuvo en cuenta que el estaño tiene 10 isótopos naturales, entre los que el <sup>120</sup>Sn es el más abundante (32.58%). Otros de sus isótopos relevantes son <sup>118</sup>Sn (24.22%), <sup>116</sup>Sn (14.54%), <sup>117</sup>Sn (7.68%) y <sup>119</sup>Sn (8.59%)<sup>157</sup>. Dado que el <sup>120</sup>Sn y el <sup>118</sup>Sn no sufren ninguna interferencia isobárica, la detección del estaño de los analitos organoestánnicos se realizó en las *m/z* 120 y 118 mientras que su cuantificación se llevó a cabo en la *m/z* 120, por ser el <sup>120</sup>Sn su isótopo más abundante.

Cada día, antes del acoplamiento de la cromatografía líquida se realizó una primera optimización de las condiciones del ICP-MS ajustando la posición de la antorcha y sintonizando el equipo para aumentar la sensibilidad y reducir la formación de óxidos e iones doblemente cargados. Para ello se empleó una disolución de optimización (*tuning solution*) de 1 µg L<sup>-1</sup> de Li, Mg, Co, Y, Ce y Tl en ácido nítrico al 2%. Tras esta optimización preliminar, la cromatografía líquida se acopló al ICP-MS, conectando la salida de la columna al nebulizador, y se realizó una optimización final utilizando como referencia el Rh añadido a la fase móvil. La optimización final de los flujos de argón es importante porque los flujos de gas nebulizador y auxiliar deben de ajustarse para

asegurar la estabilidad del plasma con las condiciones de fase móvil orgánica así como para maximizar la señal en la  $m/z$  103 correspondiente al Rh. Dado que las condiciones óptimas pueden variar ligeramente con el tiempo, este procedimiento se efectuó cada vez que se encendió el equipo.

### 3.4.3. Resumen de las condiciones cromatográficas de separación y detección

En la Tabla 3.10 se recoge un resumen de las condiciones cromatográficas de separación seleccionadas, así como de las condiciones de operación del ICP-MS para la determinación de los OTCs objeto de estudio.

Tabla 3.10. Resumen de las condiciones cromatográficas y del detector utilizados en el presente trabajo.

LC	Columna cromatográfica	Mediterranea Sea18 de 100 x 2.1 mm D.I., 3 µm de tamaño de partícula
	Composición de la fase móvil	Agua-Acetonitrilo-Ácido acético (50:40:10) + 1 µg L <sup>-1</sup> de Rh
	Flujo de la fase móvil	0.3 mL min <sup>-1</sup>
ICP-MS	Potencia de radio frecuencia	1550 W
	Flujo de gas plasmógeno	15 L min <sup>-1</sup>
	Flujo de gas adicional ( <i>Make-up</i> )	0.10 -0.12 L min <sup>-1</sup>
	Flujo de gas nebulizador	0.85 - 0.90 L min <sup>-1</sup>
	Flujo de oxígeno	0.1 L min <sup>-1</sup>
	Tipo de nebulizador	Microconcéntrico: MicroMist
	Velocidad de la bomba peristáltica	0.1 rps
	Cámara de nebulización	De doble paso de tipo Scott refrigerada a -5 °C
	Antorcha	Tipo Fassel (Diámetro interno 1.5 mm)
	Conos	Platino
	Posición en profundidad de la antorcha ( <i>Sampling depth</i> )	8-10 mm
	Voltajes de las lentes iónicas	
	<i>Extraction lens 1</i>	2 V
	<i>Extraction lens 2</i>	-140 V
	<i>Omega bias</i>	-30 V
	<i>Omega lens</i>	1 V
	<i>Cell input</i>	-34 V
	<i>QP focus</i>	2 V
	<i>Cell output</i>	-30 V
	<i>Octopole RF</i>	150 V
	<i>Octopole bias</i>	-6 V
	<i>QP bias</i>	-3 V
	Tiempo de integración por masa	300 ms
Isótopos monitorizados	<sup>118</sup> Sn, <sup>120</sup> Sn y <sup>103</sup> Rh	
Modo de adquisición	<i>Time Resolved Analysis (TRA)</i>	

A continuación se presenta un cromatograma típico obtenido bajo las condiciones seleccionadas de una disolución acuosa que contiene 10 µg L<sup>-1</sup> (como Sn) de cada analito.

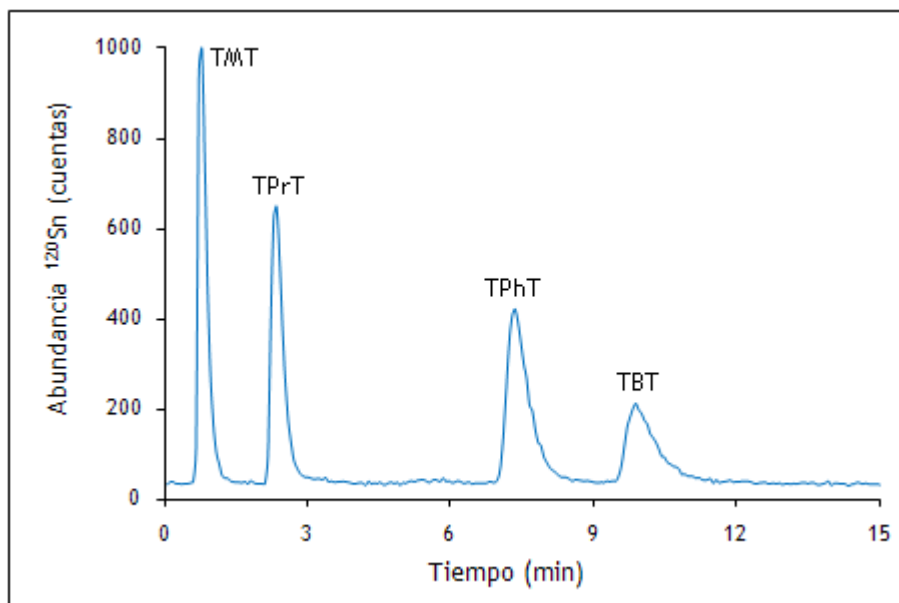


Figura 3.4. Cromatograma obtenido por LC-ICP-MS en las condiciones de la Tabla 3.10. Disolución de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de cada analito.

A pesar de que la concentración de cada analito es la misma en estaño, como puede observarse en la Figura 3.4 las áreas de los picos cromatográficos difieren ligeramente, indicando que la respuesta del estaño es diferente para cada una de las especies, algo que ya ha sido descrito en la bibliografía<sup>158</sup>.

#### 3.4.4. Estudio preliminar de reproducibilidad

Con el objetivo de confirmar que el método LC-ICP-MS descrito proporciona suficiente estabilidad de plasma y condiciones de LC reproducibles, se realizó un estudio preliminar de reproducibilidad.

Por otro lado, previamente al acoplamiento de la interfase SPME/LC resultaba necesario comprobar que la inyección en la columna cromatográfica de volúmenes próximos al de la cámara de desorción de la interfase de SPME (de  $60 \mu\text{L}$ , por encima del volumen de inyección recomendado para la columna cromatográfica empleada) no suponía una pérdida de reproducibilidad. Para ello se realizaron 5 inyecciones consecutivas de dos disoluciones estándar de  $5$  y  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de cada analito en

fase móvil tanto en un bucle de inyección de 10  $\mu\text{L}$  (volumen recomendado por el fabricante para la columna cromatográfica utilizada) como en un bucle de inyección de 50  $\mu\text{L}$ . Las condiciones de operación del ICP-MS y las condiciones de separación cromatográfica fueron las citadas en la Tabla 3.10.

Las desviaciones estándar relativas (RSD, %) de las áreas de los picos cromatográficos para ambos bucles y a ambos niveles de concentración se muestran en la Tabla 3.11. Como puede observarse, con el bucle de inyección de 50  $\mu\text{L}$  la reproducibilidad, lejos de empeorar, incluso mejoraba, siendo las RSD (%) inferiores que con el bucle de 10  $\mu\text{L}$  para tres de los cuatro analitos.

Tabla 3.11. Desviación estándar relativa a dos niveles de concentración para determinaciones de TMT, TPrT, TPhT y TBT (como Sn) por LC-ICP-MS.

Analito	RSD (% , n = 5) Loop de 10 $\mu\text{L}$		RSD (% , n = 5) Loop de 50 $\mu\text{L}$	
	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	50 $\mu\text{g L}^{-1}$
TMT	3.7	2.3	3.6	3.1
TPrT	8.0	4.6	4.5	2.4
TPhT	5.2	2.0	3.1	2.0
TBT	4.8	4.1	1.8	2.9

En consecuencia, se concluyó que la inyección en la cámara de desorción de la interfase SPME/LC de volúmenes superiores al recomendado por el fabricante de la columna cromatográfica seleccionada no suponía empeoramiento en la reproducibilidad del análisis.

## 3.5. Desarrollo de un método de microextracción en fase sólida

Este apartado describe el desarrollo del método de SPME para la preconcentración de los analitos y su acoplamiento en línea a la cromatografía líquida e ICP-MS. En primer lugar se trata el acoplamiento de esta técnica a LC e ICP-MS, posteriormente se detalla la optimización de las variables que influyen, y finalmente, se describe la evaluación analítica del método.

### 3.5.1. Acoplamiento de la SPME a LC-ICP-MS

El acoplamiento de la microextracción en fase sólida *on-line* a la cromatografía líquida con ICP-MS como detector es directo y sencillo. La conexión consiste en sustituir el inyector manual por la interfase comercial (Figura 3.2), conectando la salida de la fase móvil desde la bomba a la interfase y ésta a la entrada de la columna cromatográfica.

Sin embargo, existen ciertas consideraciones a tener en cuenta al trabajar con las tres técnicas acopladas. Por un lado, como ya se ha mencionado, hay que garantizar que el volumen interno de la cámara de la interfase SPME/LC (60  $\mu$ L en el caso de la cámara con la que se ha realizado éste trabajo) es compatible con la columna cromatográfica empleada, y ésta, a su vez, con el flujo al que opera el nebulizador del ICP-MS. Además, los tubos de conexión entre la interfase y la columna cromatográfica, y ésta y el sistema de introducción de muestras del ICP-MS han de ser lo más cortos posible para minimizar el volumen muerto y evitar así el consiguiente ensanchamiento de los picos cromatográficos. En la Figura 3.5 se muestra una fotografía de la disposición de la

interfase de SPME, la columna cromatográfica y el sistema de introducción de muestras del ICP-MS para el presente trabajo.

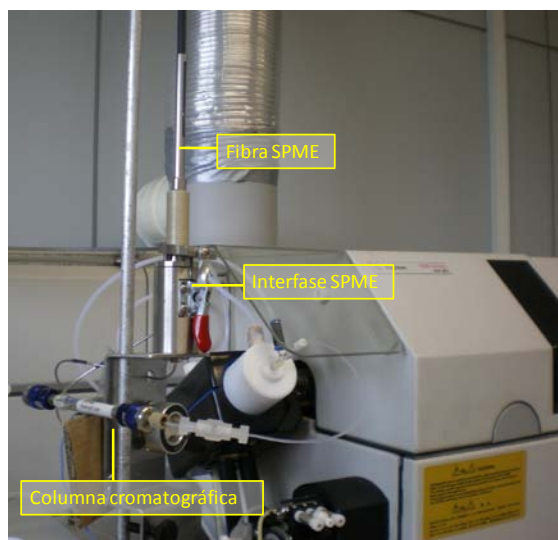


Figura 3.5. Disposición de la interfase de SPME, la columna cromatográfica y el sistema de introducción de muestras del ICP-MS.

Por otro lado, en caso de que se requiera una desorción estática con un disolvente de desorción con alto contenido de disolvente orgánico, cabe la posibilidad que la introducción del mismo al ICP-MS apague el plasma, en cuyo caso sería necesaria una mayor introducción de oxígeno al ICP-MS para evitarlo.

A pesar de que la conexión de las tres técnicas no es complicada, el acoplamiento *on-line* de la SPME a LC-ICP-MS no se ha recogido, hasta la fecha, en la bibliografía. Las escasas publicaciones que afirman combinar SPME a cromatografía líquida con ICP-MS como detector<sup>159-161</sup> tratan en realidad sobre el empleo de polímeros orgánicos conductores electro-sintetizados utilizados como elementos de SPME. En la metodología descrita en estas publicaciones, se da una migración de los analitos desde la muestra al polímero por la aplicación de un potencial, que al ser revertido, hace que éstos sean expulsados del polímero a un volumen inferior al inicial, volumen éste que es inyectado en el sistema de LC de forma convencional (mediante un bucle de inyección), sin un acoplamiento *on-line* al sistema de LC.



### 3.5.2. Estudio de las variables experimentales de la SPME *on-line* con LC-ICP-MS

El estudio de las variables que influyen en las dos etapas fundamentales de la SPME (extracción y desorción) se basó en la medida de la señal (área) de los picos cromatográficos.

Para desarrollar el procedimiento SPME de extracción y concentración de los analitos de muestras de agua se llevó a cabo un estudio de optimización paso a paso de los principales parámetros que tienen influencia en dicho proceso. Para ello, la etapa de extracción se realizó mediante inmersión directa de la fibra en 3 mL de una solución estándar conjunta de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de cada uno de los cuatro analitos en agua en condiciones de agitación a velocidad constante, empleándose viales de 4 mL e imanes de agitación magnética de 0.8 mm de longitud (Figura 3.6). Para evaluar el efecto memoria o *carry-over*, después de cada análisis la fibra se dejó en la cámara de desorción y se realizó una segunda desorción en modo dinámico dejando la válvula de la interfase en posición de inyección durante todo el análisis. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Dado que el procedimiento exigía la introducción de la fibra en disolventes orgánicos y sales, la fibra se lavó con agua durante 4 min en agitación después de cada extracción.



Figura 3.6. Etapa de extracción.

### 3.5.2.1. Elección del tipo de fibra

La elección del tipo de película que recubre la fibra es un paso fundamental en el estudio de las variables de la SPME, ya que influye directamente en la eficiencia de la extracción de los analitos de la muestra.

Las fibras inicialmente seleccionadas fueron acondicionadas según las recomendaciones de la casa comercial. En este caso la activación de las fibras se llevó a cabo con fase móvil durante 30 min.

Con el fin de determinar cuál de los rellenos disponibles presenta la mayor afinidad por los OTCs objeto de estudio, se realizaron ensayos con 4 tipos de fibras: Carbowax/Templated Resin 50  $\mu\text{m}$  (CW/TPR), Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno 60  $\mu\text{m}$  (PDMS/DVB), Poliácrlato 85  $\mu\text{m}$  (PA) y Polidimetilsiloxano 100  $\mu\text{m}$  (PDMS), que poseen una polaridad decreciente.

Polar  $\Rightarrow$  CW/TPR  $\Rightarrow$  PDMS/DVB  $\Rightarrow$  PA  $\Rightarrow$  PDMS  $\Rightarrow$  Apolar

Inicialmente la extracción se llevó a cabo durante 60 min mientras que la desorción se realizó en modo dinámico durante todo el análisis para asegurar la desorción total de los analitos. De los resultados obtenidos se observó que la fibra de PDMS/DVB permitía obtener la mejor eficiencia de extracción para el TMT, el TPrT y el TPhT, mientras que la fibra más polar, CW/TPR, exhibía una extracción ligeramente mejor para el TBT. A modo de compromiso entre las diferentes eficiencias de extracción, la fibra de PDMS/DVB fue elegida para el resto de los experimentos.

### 3.5.2.2. Etapa de extracción

La eficiencia de la extracción de los analitos por SPME puede variar ampliamente en función del ajuste de fuerza iónica y  $\text{pH}^{63}$ , un adecuado tiempo de extracción y la temperatura de la muestra<sup>162</sup>. Para el estudio de estas variables se optó por la desorción

dinámica durante todo el análisis, evaluándose en todo momento el efecto memoria o *carry-over*.

### ***Fuerza iónica***

El efecto de la fuerza iónica ha sido estudiado en aplicaciones de SPME principalmente mediante adición de cloruro sódico y sales divalentes ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  o  $\text{MgSO}_4$ ). En algunos casos la adición de sal puede favorecer la extracción de los analitos aumentando la fuerza iónica y reduciendo la solubilidad de los analitos en agua<sup>163</sup>. Algunos autores están de acuerdo en el efecto positivo de la adición de cloruro sódico a la muestra en el proceso de extracción de la mayoría de los compuestos; sin embargo, se han encontrado ciertas discrepancias apuntando que no existe una relación directa entre la eficacia de la extracción y la adición de sal<sup>62, 162</sup>.

Para el estudio de la influencia de la fuerza iónica se llevaron a cabo ensayos con NaCl, ya que su adición causa menos problemas durante el proceso de limpieza de la fibra<sup>62</sup>. Aún así, para evitar la cristalización de NaCl en el recubrimiento de la fibra, se recomienda lavarla en agua después de cada análisis. Su efecto fue estudiado en extracciones de 30 min añadiendo la sal a las disoluciones hasta obtener concentraciones entre 0 y 200 g L<sup>-1</sup>.

En la Figura 3.7 se muestra la influencia del NaCl en la extracción, establecida representando la respuesta cromatográfica expresada como las áreas de pico del <sup>120</sup>Sn frente a la concentración de sal. Como puede observarse, las recuperaciones más altas para TPrT, TPhT y TBT se obtuvieron cuando se adicionaron 75 g L<sup>-1</sup> de NaCl, mientras que en el caso del TMT la señal fue ligeramente superior para mayores concentraciones de NaCl. Por tanto, se decidió adicionar 75 g L<sup>-1</sup> de NaCl en cada extracción.

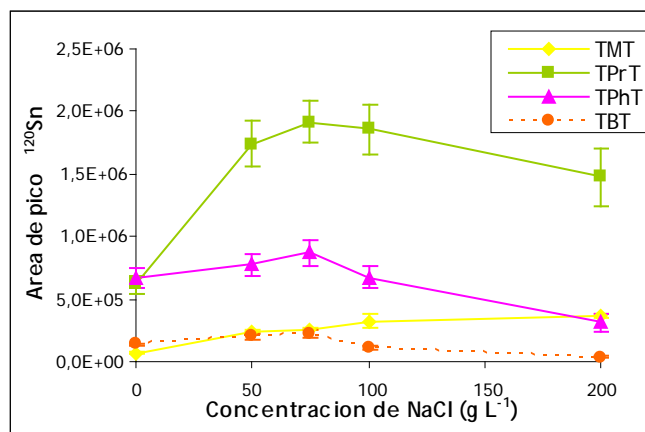


Figura 3.7. Efecto de la fuerza iónica en la eficacia del proceso de extracción. Patrón de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de cada analito. Extracción: 30 min. Desorción dinámica con fase móvil durante todo el análisis.

### *pH*

A continuación se realizó el estudio de la influencia del pH de la disolución en la extracción. Para ello se añadieron a la solución estándar, además de  $75 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl,  $30 \mu\text{L}$  de tampón ácido acético / acetato de sodio, fosfato disódico/ dihidrógeno fosfato de sodio, o hidróxido de amonio / cloruro amónico para el ajuste del pH a valores comprendidos entre 4 y 8.6, realizándose extracciones de 30 min. Se ensayó un pH por debajo de los valores de  $\text{pK}_a$  de los analitos ( $\text{pH} = 4$ ), el pH de la muestra (6.5) y tres valores de pH por encima del de la muestra (7, 8 y 8.6).

Los resultados obtenidos revelaron que valores de pH por encima de 7 implicaban una disminución en la extracción, mientras que al valor de pH por debajo de los  $\text{pK}_a$  de los analitos, excepto para el TPhT, no se observaron cambios significativos en la cantidad extraída. En consecuencia, se decidió realizar el proceso de extracción al pH del patrón acuoso (6.5) (Figura 3.8).

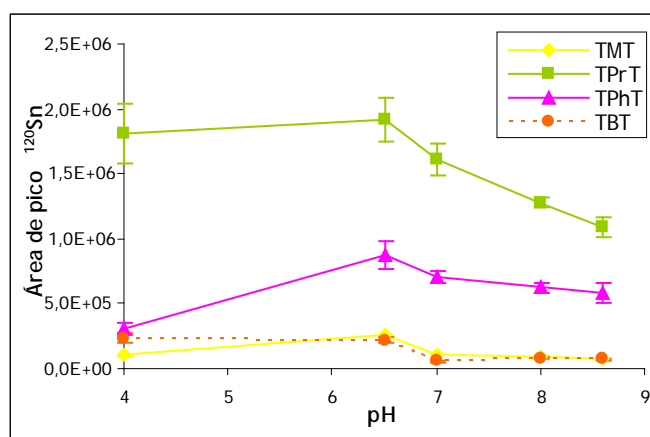


Figura 3.8. Efecto del pH en la eficacia del proceso de extracción. Patrón de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de cada analito con  $75 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl. Extracción: 30 min. Desorción dinámica con fase móvil durante todo el análisis.

### *Adición de modificador orgánico*

Se sabe que determinados porcentajes de disolventes orgánicos pueden modificar el coeficiente de reparto, influyendo así en la extracción, por lo que se estudió la adición de acetonitrilo y metanol en un intervalo comprendido entre 0 y 20%. Los modificadores orgánicos se añadieron a las disoluciones a las que previamente se les había añadido NaCl en una concentración de  $75 \text{ g L}^{-1}$  y se realizaron extracciones de 30 min. Como puede observarse en la Figura 3.9, en la mayoría de los casos un aumento en la concentración de acetonitrilo o metanol conlleva una disminución de la eficiencia de extracción. A pesar de que para el TMT el efecto de la adición de bajos porcentajes de modificador orgánico era ligeramente positivo, la extracción se llevó a cabo sin adición de modificador orgánico.

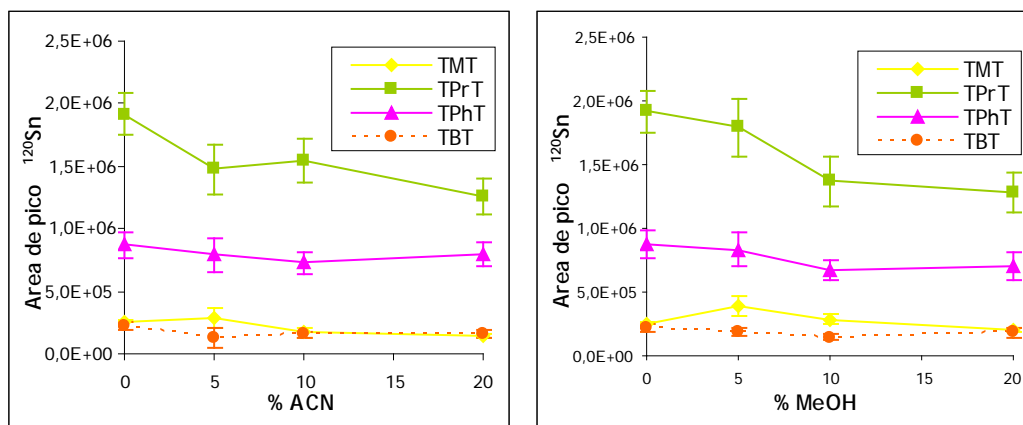


Figura 3.9. Efecto del porcentaje de acetonitrilo y metanol en la eficacia del proceso de extracción. Patrón de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de cada analito con  $75 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl. Extracción: 30 min. Desorción dinámica con fase móvil durante todo el análisis.

### Tiempo de extracción

Para asegurar una extracción eficiente de los analitos desde la muestra, uno de los pasos más importantes en el desarrollo de un método de microextracción en fase sólida es la determinación del tiempo necesario para que el proceso de extracción alcance el equilibrio entre la matriz de la muestra y la película de la fibra<sup>62</sup>.

El tiempo de extracción se estudió variando el tiempo de exposición de la fibra a la disolución estándar que contenía  $75 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl entre 15 y 60 min. En la Figura 3.10 se muestra la variación de las respuestas cromatográficas obtenidas para cada analito dependiendo del tiempo de extracción. Como se ha comentado, en este tipo de extracciones no resulta necesario alcanzar un equilibrio completo en tanto en cuanto el tiempo de exposición a la fibra se mantenga exactamente constante. Por lo tanto, y a pesar de que no se alcanzó el equilibrio para el TMT, se seleccionó un tiempo de extracción de 45 min, observándose que a este tiempo la respuesta obtenida para todos los analitos exhibía una reproducibilidad aceptable.

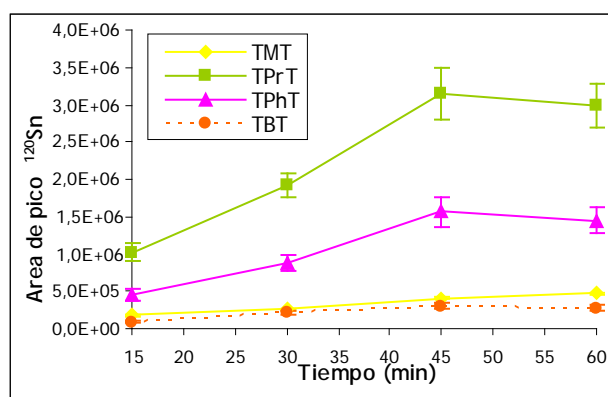


Figura 3.10. Efecto del tiempo de extracción. Patrón de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de cada analito con  $75 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl. Desorción dinámica con fase móvil durante todo el análisis.

### Temperatura de extracción

Para finalizar la optimización de la etapa de extracción se estudió la influencia de la temperatura en la eficiencia de la extracción. Se ensayaron tres temperaturas diferentes de extracción, temperatura ambiente ( $21 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ),  $45$  y  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ , para extracciones de  $45 \text{ min}$  con  $75 \text{ g L}^{-1}$  de cloruro sódico. En la Figura 3.11 se observa que excepto para el TMT se da una disminución de la respuesta con el aumento de la temperatura, por lo que se decidió llevar a cabo las extracciones a temperatura ambiente.

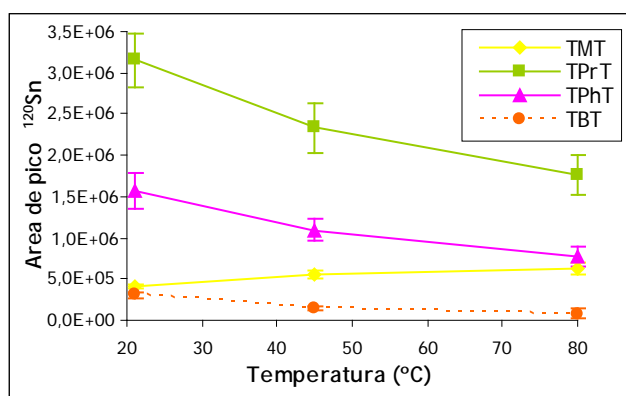


Figura 3.11. Efecto de la temperatura de extracción. Patrón de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de cada analito con  $75 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl. Extracción:  $45 \text{ min}$ . Desorción dinámica con fase móvil durante todo el análisis.

### 3.5.2.3. Etapa de desorción

Como ya se ha descrito anteriormente, existen dos modos de desorción en la interfase SPME/LC, la estática y la dinámica, que difieren en la forma de eluir los compuestos retenidos en la fibra. En ambos casos, el objetivo es asegurar una completa desorción de los analitos de la fibra para conseguir la máxima sensibilidad y evitar el fenómeno del “efecto memoria” (*carry-over*). La elección del modo dinámico *versus* estático depende de la velocidad de desorción: para analitos que se desorben rápido se recomienda el modo dinámico, mientras que para analitos que se desorben lentamente se consiguen picos más afilados al optar por la desorción estática.

En los ensayos realizados en modo dinámico, la fibra, después de la extracción, se introdujo en la interfase permitiendo que la fase móvil con un flujo de  $0.3 \text{ mL min}^{-1}$  atravesara la cámara de desorción durante un intervalo de tiempo comprendido entre 2 y 7 min. En estas condiciones, las recuperaciones no fueron del todo satisfactorias, probablemente debido al flujo de fase móvil, adecuado para la columna y el nebulizador utilizado, pero menor que los flujos habitualmente empleados en SPME/LC. Además, se observó un ensanchamiento de los picos cromatográficos a medida que el tiempo de desorción aumentaba. En la Figura 3.12 se muestran los resultados obtenidos para la desorción dinámica.

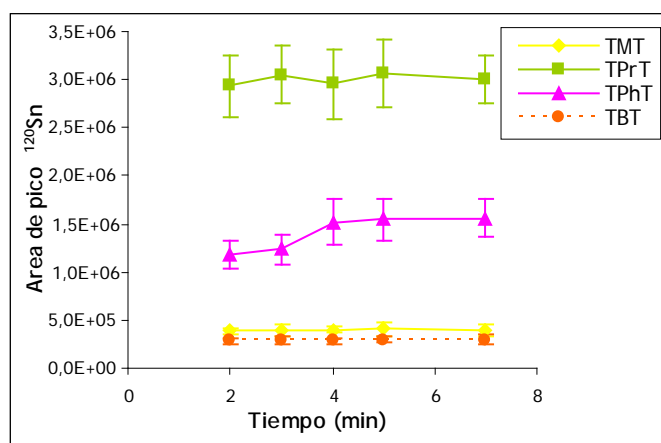


Figura 3.12. Efecto del tiempo de desorción dinámica. Patrón de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de cada analito con  $75 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl. Extracción: 45 min.



Posteriormente, se procedió a la optimización de la desorción en modo estático, estudiándose la capacidad de elución de una serie de disolventes en periodos de tiempo entre 1 y 10 min, tras los cuales la válvula se cambió a la posición de inyección exponiendo la fibra al flujo de fase móvil durante un minuto. Para ello, el disolvente era introducido en la cámara de desorción con una jeringa de cristal de 500  $\mu\text{L}$ . Se evaluaron diferentes mezclas de acetonitrilo, metanol, agua, ácido acético y fase móvil. Se observó que la presencia de ácido acético en el disolvente de desorción aumentaba la eficiencia de la extracción, algo predecible dada la extendida utilización del ácido acético para la extracción de OTCs en la bibliografía<sup>164, 132, 165</sup>. Finalmente, las mejores recuperaciones se obtuvieron dejando la fibra en fase móvil dentro de la cámara de desorción durante 5 min. Para este tiempo de desorción y con un minuto de inyección no hubo evidencias de *carry-over*, por lo que fueron las condiciones de desorción seleccionadas. Los resultados obtenidos para desorción estática con fase móvil se presentan en la Figura 3.13.

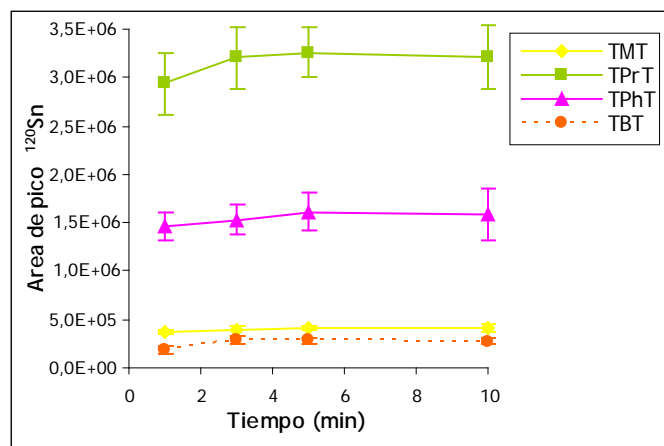


Figura 3.13. Efecto del tiempo de desorción con desorción estática en fase móvil. Patrón de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de cada analito con  $75 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl. Extracción: 45 min.

### 3.5.3. Resumen de las condiciones experimentales de la SPME

En la Tabla 3.12 se recoge un resumen de las condiciones experimentales para el procedimiento de microextracción en fase sólida (SPME) desarrollado para los OTCs objeto de estudio.

Tabla 3.12. Resumen de las condiciones experimentales de la SPME.

SPME	Tipo de fibra	PDMS/DVB 60 $\mu\text{m}$
	Tiempo de extracción	45 min
	pH de extracción	pH de la muestra ( $\approx 6.5$ )
	Fuerza iónica (NaCl)	Adición de 75 g L <sup>-1</sup>
	Temperatura de extracción	Temperatura ambiente ( $21 \pm 1$ °C)
	Modo de desorción	Estática (fase móvil)
	Tiempo de desorción	5 min estático + 1 min inyección

A continuación se presenta un cromatograma típico de un patrón acuoso que contiene  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de los cuatro OTCs obtenido según las condiciones recogidas en las Tablas 3.10 y 3.12:

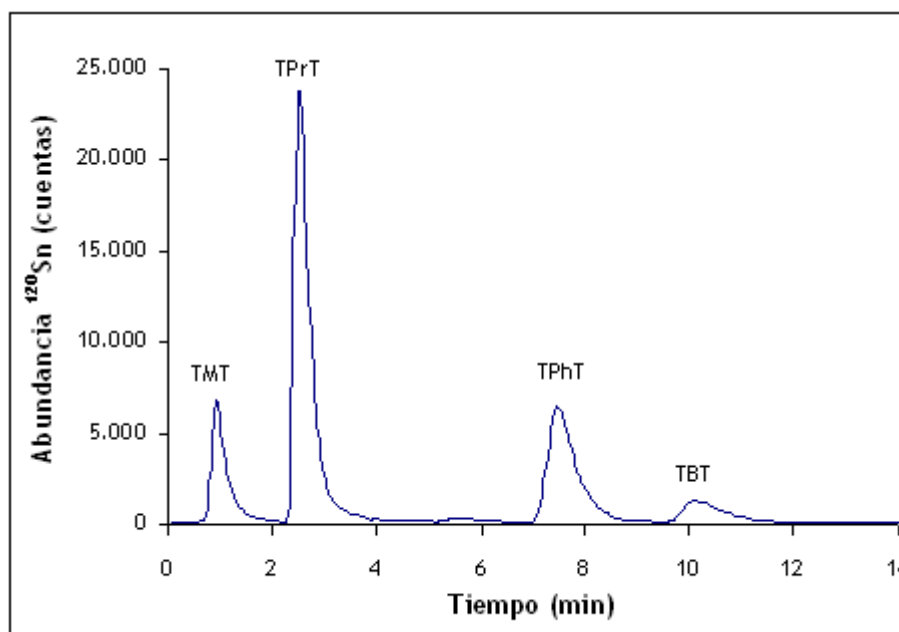


Figura 3.14. Cromatograma obtenido por SPME/LC-ICP-MS con una fibra de PDMS/DVB bajo las condiciones de extracción seleccionadas. Patrón acuoso de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de TMT, TPrT, TPhT y TBT.

Como puede observarse, y cabía esperar, los diferentes analitos tienen diferentes eficiencias de extracción bajo las condiciones seleccionadas. Por ello, los factores de preconcentración,  $\rho$  (el ratio entre las áreas de los picos obtenidos con SPME y las correspondientes con inyección directa) dependen del analito. En las condiciones

experimentales seleccionadas y para un nivel de concentración de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , estos valores fueron:  $\rho_{\text{TMT}} = 9.5$ ,  $\rho_{\text{TPt}} = 32.2$ ,  $\rho_{\text{TPt}} = 23.8$  y  $\rho_{\text{TBT}} = 11.7$ .

### 3.5.4. Evaluación analítica del método SPME/LC-ICP-MS

Para llevar a cabo la evaluación analítica del método SPME/LC-ICP-MS se realizaron, en primer lugar, los calibrados para cada uno de los compuestos, trabajando siempre en las condiciones de extracción, cromatográficas y de detección previamente seleccionadas.

Una vez realizado el calibrado, se calcularon los límites de detección de cada uno de los compuestos, y a continuación se llevó a cabo el estudio de la variabilidad del método analítico evaluando su repetitividad.

#### 3.5.4.1. Calibrado del método

En este trabajo la calibración del método se llevó a cabo por comparación con patrones. Para ello se analizaron una serie de patrones en agua conteniendo los analitos en una concentración comprendida entre el límite de cuantificación ( $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  ó  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  en función del analito) y  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn), y se determinó el área de sus respectivas señales cromatográficas. Se estudió la variación de la respuesta del ICP-MS con la concentración, midiendo el área de los picos cromatográficos obtenidos para cada analito. Los parámetros de las regresiones lineales de las rectas de calibrado obtenidas se recogen en la Tabla 3.13.

Tabla 3.13. Parámetros de las regresiones lineales de las rectas de calibrado de los compuestos del estudio. Condiciones experimentales según las Tablas 3.10 y 3.12.

Analito	Pendiente $\pm$ SD (Área/ $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Ordenada $\pm$ SD (Área)	r	IC de la ordenada*
TMT	$1.28 \cdot 10^5 \pm 2 \cdot 10^3$	$-4 \cdot 10^4 \pm 3 \cdot 10^4$	0.999	$-1.2 \cdot 10^5, 4 \cdot 10^4$
TPrT	$6.4 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^4$	$-3 \cdot 10^5 \pm 3 \cdot 10^5$	0.994	$-1.2 \cdot 10^6, 6 \cdot 10^5$
TPhT	$3.4 \cdot 10^5 \pm 3 \cdot 10^4$	$-2 \cdot 10^5 \pm 3 \cdot 10^5$	0.991	$-1.1 \cdot 10^6, 7 \cdot 10^5$
TBT	$5.3 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4 \pm 2 \cdot 10^4$	0.999	$-5 \cdot 10^4, 1.5 \cdot 10^5$

\* IC: Intervalo de confianza.

Los valores de los coeficientes de correlación de las regresiones lineales y el error asociado tanto a la pendiente como a la ordenada en el origen ponen de manifiesto que el ajuste realizado utilizando el método de los mínimos cuadrados para la obtención de dichas rectas de calibrado es satisfactorio.

Una vez realizada la regresión lineal para cada uno de los compuestos, se llevó a cabo el análisis estadístico del ajuste para decidir si se acepta el modelo de regresión propuesto.

Para ello los principales parámetros a considerar fueron: el coeficiente de correlación, que fue en todos los casos superior a 0.991, y el intervalo de confianza de la ordenada en el origen, que para un nivel de confianza del 95% incluía el valor cero.

De todo ello se dedujo que el modelo de regresión lineal propuesto para cada uno de los compuestos se ajustaba adecuadamente al conjunto de los datos obtenidos.

#### 3.5.4.2. Límites de detección

Una vez aceptado el modelo de regresión propuesto para la calibración del método analítico se procedió a calcular los límites de detección para cada uno de los analitos.

La IUPAC en 1987<sup>166</sup>, definió en el *Compendio de Nomenclatura Analítica* el límite de detección como la concentración o la cantidad de analito derivada de la medida más

pequeña ( $X_{LOD}$ ) que puede detectarse con una certeza razonable mediante un determinado método analítico, proponiendo la siguiente ecuación:

$$X_{LOD} = \bar{x}_B + k\sigma_B \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde  $\bar{x}_B$  es el valor medio de un cierto número de medidas del blanco y  $\sigma_B$  la desviación estándar de esas medidas. El factor  $K$  es un factor numérico seleccionado de acuerdo con el nivel de confianza deseado, siendo 3 el valor recomendado.

Al igual que la IUPAC, el profesor Valcárcel<sup>167</sup>, propone un valor de 3 para el factor  $K$ , definiendo, sin embargo  $\bar{x}_B$  como el valor de la ordenada en el origen ( $X_B$ ). En este trabajo se ha adoptado este mismo criterio ya que una señal de un blanco por debajo del valor de la ordenada en el origen no tiene significación analítica.

La transformación de la señal del límite de detección en la correspondiente concentración o cantidad se realiza a través de una recta de calibrado. De esta manera, el límite de detección es la concentración del analito ( $C_{LOD}$ ) que produce una señal  $X_{LOD}$  que puede ser estadísticamente distinguible de la señal del blanco, siendo  $X_{LOD} = \bar{x}_B + k\sigma_B$  la mínima señal que el método es capaz de detectar. Sustituyendo ese valor en la recta de regresión del método, se obtiene:

$$\bar{x}_B + k\sigma_B = SC_{LOD} + X_B \quad \text{Ecuación 3.2}$$

donde  $S$  es la pendiente de la recta y  $C_{LOD}$  la concentración mínima que el método puede determinar. Despejando este último factor de la expresión y suponiendo que  $X_B = \bar{x}_B$ :

$$C_{LOD} = \frac{K\sigma_B}{S} = \frac{3\sigma_B}{S} \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Para el cálculo del límite de detección a partir de señales continuas en el tiempo, como es el caso de las técnicas cromatográficas, las señales se manifiestan en forma de un pico transitorio superpuesto a un ruido de fondo más o menos importante. Para estimar la

magnitud del ruido se realizan mediciones sobre la línea base de un cromatograma obtenido con un blanco o con una muestra. Existen en bibliografía diversos criterios<sup>168, 169</sup> respecto al intervalo de tiempo durante el cual hay que medir el ruido.

En este trabajo para estimar el ruido se han realizado mediciones sobre la línea base al periodo de tiempo de elución de cada analito.

Según este criterio se procedió al cálculo del límite de detección del método analítico para cada uno de los compuestos estudiados expresándose en  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Dichos valores aparecen recogidos en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14. Valores de los límites de detección (como  $S_n$ ) para los OTCs objeto de estudio.

Analito	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
TMT	0.135
TPrT	0.006
TPhT	0.011
TBT	0.185

#### 3.5.4.3. Límites de cuantificación

Los límites de cuantificación, la mínima concentración de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión, se han determinado de acuerdo a las pautas establecidas por la Unión Europea<sup>170</sup> como la mínima concentración de la recta de calibrado a la cual el coeficiente de variación es menor al 20% y la precisión está entre el 70 y el 120 %. Los valores de los límites de cuantificación se recogen en la Tabla 3.15. También se recogen los límites de cuantificación calculados de acuerdo al criterio IUPAC (que se define, de manera análoga al límite de detección, como 10 veces la desviación estándar del ruido dividido entre la pendiente de la recta de calibrado).

Tabla 3.15. Valores de los límites de cuantificación (como Sn) para los OTCs objeto de estudio calculados de acuerdo a los criterios de la Unión Europea (UE) e IUPAC.

Analito	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	
	UE	IUPAC
TMT	0.5	0.451
TPrT	0.3	0.019
TPhT	0.5	0.038
TBT	1.0	0.616

Como cabía esperar, algunos de los valores de los límites de cuantificación difieren considerablemente, ya que los criterios de cálculo son muy diferentes. Los valores obtenidos siguiendo las recomendaciones de la Unión Europea son más realistas, ya que su determinación se ha llevado a cabo experimentalmente.

#### 3.5.4.4. Repetitividad

Con el fin de conocer la variabilidad del método analítico SPME/LC-ICP-MS desarrollado para la determinación de OTCs, se procedió a estudiar la repetitividad de los resultados obtenidos en el análisis de una misma muestra. Se define repetitividad<sup>167</sup> como la dispersión de los resultados obtenidos, utilizando para llevar a cabo el análisis el mismo método analítico, el mismo tipo de matriz y habiéndolo realizado en el mismo laboratorio, por el mismo operador y utilizando el mismo equipamiento.

La *repetitividad en el día* estudia la variabilidad del método propuesto en los análisis realizados dentro del mismo día. Para su estimación se realizaron 10 medidas a lo largo de un mismo día y para dos niveles distintos de concentración.

La *repetitividad entre días* permite estimar la variabilidad del método analítico propuesto en un determinado período de tiempo. En este caso para su estimación se repitió el mismo proceso que para la repetitividad en el día pero a lo largo de 10 días.

Según la Legislación Europea<sup>170</sup>, la repetitividad debe expresarse como desviación estándar relativa (RSD, %) indicando el número de muestras (n). En general, los valores de RSD deben ser iguales o inferiores al 20%.

Para su estimación se analizaron patrones acuosos con 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de todos los analitos en el día y entre días. Los valores de la desviación estándar relativa están recogidos en la Tabla 3.16.

Tabla 3.16. Repetitividad del método en el día y entre días (n = 10) expresada como la desviación estándar relativa (RSD) a dos niveles de concentración.

Analito	Repetitividad en el día (RSD, %)		Repetitividad entre días (RSD, %)	
	1 $\mu\text{g L}^{-1}$	5 $\mu\text{g L}^{-1}$	1 $\mu\text{g L}^{-1}$	5 $\mu\text{g L}^{-1}$
TMT	3.2	7.2	7.7	4.5
TPrT	13.0	5.4	18.2	16.1
TPhT	13.7	3.5	19.2	16.9
TBT	13.6	10.9	14.7	3.2

En todos los casos los coeficientes de variación obtenidos fueron inferiores al 14% para la *repetitividad en el día*, e inferiores al 20% para la *repetitividad entre días*, por lo que se puede concluir que la repetitividad del método analítico desarrollado está dentro de los límites aceptables para la SPME y cumplen la Legislación Europea.



### 3.6. Aplicación de la metodología analítica desarrollada a muestras reales

La utilización extendida de los OTCs ha hecho que éstos se acumulen en diversos ecosistemas. Dada su elevada toxicidad hoy en día están considerados contaminantes prioritarios por la Unión Europea tanto en el Registro de Emisiones Contaminantes (2000/479/EC) como en la Directiva Marco del Agua (2000/60/EC). Por todo ello, el análisis y la monitorización de los OTCs en muestras ambientales resulta de gran importancia.

La metodología analítica propuesta (SPME/LC-ICP-MS) se aplicó al análisis de muestras del puerto costero de Bermeo (Bizkaia) y de agua dulce del puerto deportivo del Club Náutico Aldayeta en el embalse de Ullibarri- Gamboa (Álava). El muestreo en ambos puertos se llevó a cabo en zonas cercanas a los amarraderos de los barcos, introduciendo botes de vidrio ámbar de 250 mL, sujetos a un cable y unidos a un peso para su hundimiento. Los frascos fueron perfectamente cerrados e identificados con la fecha y zona de muestreo, trasladándolos al laboratorio en condiciones de refrigeración (4 °C). El muestreo se realizó por duplicado en cinco puntos diferentes de cada emplazamiento. La situación de ambas zonas se muestra en los mapas de la Figura 3.15.



Figura 3.15. Situación de las zonas de muestreo en la Comunidad Autónoma del País Vasco.

Las muestras recogidas se filtraron usando un sistema Millipore, con membranas de  $0.45\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro (Scharlab, Barcelona, España) y se almacenaron a  $-42\ ^\circ\text{C}$  en oscuridad hasta su análisis mediante la metodología analítica propuesta. Su pH se ajustó a 6.5 con tampón fosfato.

En el caso de las muestras de elevada concentración salina, como es el caso del agua de mar, la utilización de la SPME evita la introducción de la matriz al ICP-MS. Los altos contenidos de sales disueltas en el agua de mar dificultan su análisis ya que causan deriva instrumental, interferencias espectrales, supresión de la señal y obturación del sistema de introducción de muestras<sup>171</sup>. Por otro lado, la concentración de sal del agua

marina puede modificar la extracción de los analitos a la fibra de microextracción. Por ello, teniendo en cuenta que la concentración salina en el agua de mar en nuestras latitudes se estima en  $35 \text{ g L}^{-1}$ , la adición de sal a las muestras de agua del puerto de Bermeo en la etapa de extracción se ajustó para obtener la concentración óptima ( $75 \text{ g L}^{-1}$ ), garantizando así que la extracción se llevaba a cabo a la concentración de sal adecuada.

En ninguna de las muestras analizadas se detectaron interferencias (tal y como se observa en la Figura 3.16 -línea roja-) y sólo una de las muestras del puerto deportivo del embalse de Ullibarri-Gamboa presentó  $1.01 \mu\text{g L}^{-1}$  de TMT.

La exactitud del método propuesto fue comprobada en dos de las muestras analizadas que no presentaron residuos de los compuestos objeto de estudio, una de agua dulce y otra de agua marina, que fueron dopadas con una disolución patrón de los analitos a un nivel de concentración de  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito (como Sn) por triplicado. Para el cálculo de las recuperaciones los resultados se compararon con los obtenidos en un análisis similar de disoluciones patrón de la misma concentración preparadas en agua Milli-Q. Como puede observarse en la Tabla 3.17, las recuperaciones obtenidas oscilaron entre 71 y 104%, con desviaciones estándar inferiores a 20% en todos los casos. Estos resultados permiten confirmar la validez del método desarrollado para el análisis de los OTCs seleccionados (TMT, TPrT, TPhT y TBT) tanto en agua dulce como en agua de mar.

Tabla 3.17. Recuperaciones medias de los analitos en muestras de agua dopadas mediante SPME/LC-ICP-MS. Nivel de concentración:  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn).

Analito	Recuperación (%), n = 3 (media $\pm$ SD)	
	Agua dulce	Agua de mar
TMT	$104 \pm 9$	$78 \pm 10$
TPrT	$99 \pm 15$	$96 \pm 11$
TPhT	$100 \pm 19$	$71 \pm 13$
TBT	$80 \pm 9$	$85 \pm 8$

En la Figura 3.16 se muestran los cromatogramas obtenidos para una muestra de agua de mar dopada y una muestra de agua dulce dopada junto con los obtenidos para la misma muestra sin dopar mediante el método SPME/LC-ICP-MS desarrollado en el presente trabajo.

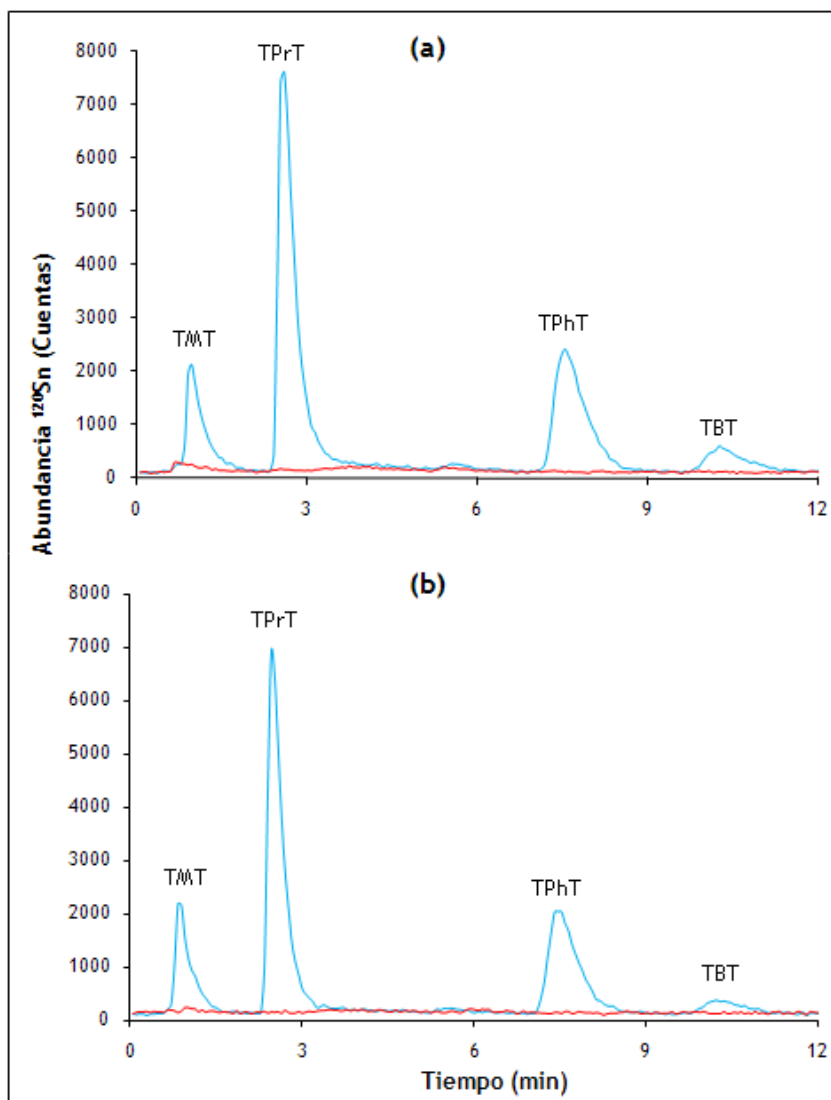


Figura 3.16. Cromatogramas obtenidos por SPME/LC-ICP-MS de: (a) Agua del embalse de Ullibarri-Gamboa; (b) Agua del puerto de Bermeo. Condiciones experimentales según las Tablas 3.10 y 3.12. Línea roja: agua sin dopar, línea azul: agua dopada conteniendo  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  (como Sn) de cada analito.

### 3.7. Conclusions

Taking into account the proposed objectives and the results obtained in this study, it can be concluded that:

1. The on-line coupling between SPME and LC-ICP-MS, never previously carried out, is feasible and could be successfully used. After taking into account some considerations regarding the volume of the fiber desorption chamber of the SPME interface, the chromatographic column and the employed ICP-MS nebulizer so that any incompatibility is avoided, the coupling has proved to be direct and straightforward.
2. The optimized method based on the hyphenation of the SPME to LC-ICP-MS offers an attractive new approach for TMT, TPrT, TPhT and TBT quantification in both freshwater and seawater samples.
3. The proposed analytical methodology shows a linear calibration that enables the determination of selected organotin compounds in a concentration range from  $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  or  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (depending on the analyte) and  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  (as Sn), with correlation coefficients ( $r$ ) higher than 0.991 in all cases.
4. Detection limits obtained range from 0.006 and  $0.185 \mu\text{g L}^{-1}$ , comparable to those obtained using direct injection LC-ICP-MS, with the added inherent advantages of the SPME, a simple, rapid and solventless technique which does not require any preliminary sample preparation step.

5. The SPME/LC-ICP-MS method achieves reproducibilities with coefficients of variation smaller than 19.2% for all the analytes. These coefficients of variation are within acceptable limits for solid phase microextraction.
  
6. The applicability of this method for the determination of the analytes in seawater has been demonstrated. The use of SPME limits the introduction of matrix to the ICP-MS, avoiding that the high contents of dissolved salts in seawater cause instrumental drift, spectral interferences, signal suppression and clogging of the sample introduction system.
  
7. The developed analytical method has been applied to the determination of TMT, TPrT, TPhT and TBT in freshwater and seawater samples. However, none of the analytes were detected in the analyzed samples. In order to evaluate the accuracy of the developed method, both freshwater and seawater samples were used for spiking experiments. The obtained results show recoveries ranging from 71 to 104%.

## Bibliografía

- [1] MONTES BAYÓN, M., DENICOLA, K. y CARUSO, J.A. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, 1000 (1-2), 457-476.
- [2] CARUSO, J.A., SUTTON, K.L. y ACKLEY, K.L. Comprehensive analytical chemistry: elemental speciation, new approaches for trace element analysis, Volume 33. Amsterdam: Elsevier, 2000. ISBN: 9780444500472.
- [3] TEMPLETON, D.M., ARIESE, F., CORNELIS, R., DANIELSSON, L.G., MUNTAU, H., VAN LEEUWEN, H.P. y LOBINSKI, R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. *Pure and Applied Chemistry*, 2000, 72 (8), 1453-1470.
- [4] CORNELIS, R., CARUSO, J., CREWS, H. y HEUMANN, K.E. Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine and occupational health. Chichester: John Wiley & Sons, 2005. ISBN: 9780470855980.
- [5] AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. SciFinder Scholar [Disponible en red de la Universidad del País Vasco] 2010. AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2007.
- [6] VAN LOON, J.C. Metal speciation by chromatography/atomic spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1979, 51 (11), 1139A-1140A, 1142A, 1144A, 1146A, 1148A, 1150A.
- [7] SUZUKI, K.T. Direct connection of high-speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis: Metallothionein. *Analytical Biochemistry*, 1980, 102 (1), 31-34.
- [8] EBDON, L., GARCÍA ALONSO, J.I., HILL, S. y HOPKINS, A. Versatile computer controlled interface system for directly coupled high-performance liquid chromatography-flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1988, 3 (2), 395-399.
- [9] EBDON, L., HILL, S.J. y JONES, P. Speciation of tin in natural waters using coupled high-performance liquid chromatography-flame atomic-absorption spectrometry. *Analyst*, 1985, 110 (5), 515-517.
- [10] TSALEV, D.L. Hyphenated vapor generation atomic absorption spectrometric techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999, 14 (2), 147-162.
- [11] SOLDADO CABEZUELO, A.B., BLANCO GONZÁLEZ, E. y SANZ-MEDEL, A. Quantitative studies of aluminum binding species in human uremic serum by fast protein liquid chromatography coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 1997, 122 (6), 573-577.
- [12] UDEN, P.C. Element-specific chromatographic detection by atomic absorption, plasma atomic emission and plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1995, 703 (1-2), 393-416.
- [13] UDEN, P.C., BIRD, S.M., KOTREBAL, M., NOLIBOS, P., TYSON, J.F., BLOCK, E. y DENOYER, E. Analytical selenoamino acid studies by chromatography with interfaced atomic

mass spectrometry and atomic emission spectral detection. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1998, 362 (5), 447-456.

[14] BROTHERTON, T., BARNES, B., VELA, N. y CARUSO, J. Evaluation of the grid-type nebulizer for organic solvent introduction into the inductively coupled plasma. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1987, 2 (4), 389-396.

[15] HILL, S.J., BLOXHAM, M.J. y WORSFOLD, P.J. Chromatography coupled with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. A review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1993, 8 (4), 499-515.

[16] WANG, S.R. y JIANG, S.J. An ultrasonic nebulizer as the sample introduction device for high performance liquid chromatography combined with inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Journal of the Chinese Chemical Society (Taipei, Taiwan)*, 1991, 38 (4), 327-332.

[17] SANZ-MEDEL, A., AIZPUN, B., MARCHANTE, J.M., SEGOVIA, E., FERNÁNDEZ, M.L. y BLANCO, E. Vesicle-mediated high-performance liquid chromatography coupled to atomic detection for speciation of toxic elements. *Journal of Chromatography A*, 1994, 683 (1), 233-243.

[18] THOMPSON, J.J. y HOUK, R.S. Inductively coupled plasma mass spectrometric detection for multielement flow injection analysis and elemental speciation by reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 1986, 58 (12), 2541-2548.

[19] LACOURSE, W.R. Column liquid chromatography: equipment and instrumentation. *Analytical Chemistry*, 2002, 74 (12), 2813-2831.

[20] AMMANN, A.A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 42 (4), 419-427.

[21] AGILENT TECHNOLOGIES. Handbook of hyphenated ICP-MS applications. USA: 2007. Número de publicación: 5989-6160EN.

[22] CARUSO, J.A. y MONTES BAYÓN, M. Elemental speciation studies-new directions for trace metal analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 56 (1), 148-163.

[23] BOORN, A.W. y BROWNER, R.F. Effects of organic solvents in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1982, 54 (8), 1402-1410.

[24] BROWNER, R.F., CANALS, A. y HERNANDIS, V. Effect of analyte and solvent transport on signal intensities in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 1992, 47B (5), 659-673.

[25] HANSELMAN, D.S., SESI, N.N., HUANG, M. y HIEFTJE, G.M. The effect of sample matrix on electron density, electron temperature and gas temperature in the argon inductively coupled plasma examined by Thomson and Rayleigh scattering. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 1994, 49B (5), 495-526.

[26] FORSGARD, N. Inductively coupled plasma spectrometry for speciation analysis. Development and applications [Tesis Doctoral]. Uppsala, Suecia: Uppsala University, Departamento de Química: Química Analítica, 2007.



- [27] WANG, T. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2007, 30 (5-7), 807-831.
- [28] FAIRMAN, B. y WAHLEN, R. Speciation analysis of organotin compounds by HPLC-ICP-MS. *Spectroscopy Europe*, 2001, 13 (5), 16,18,20,22.
- [29] SUTTON, K.L. y CARUSO, J.A. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1999, 856 (1-2), 243-258.
- [30] WIND, M., EDLER, M., JAKUBOWSKI, N., LINSCHIED, M., WESCH, H. y LEHMANN, W.D. Analysis of protein phosphorylation by capillary liquid chromatography coupled to element mass spectrometry with  $^{31}\text{P}$  detection and to electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2001, 73 (1), 29-35.
- [31] CHASSAIGNE, H. y SZPUNAR, J. The coupling of reversed-phase HPLC with ICP-MS in bioinorganic analysis. *Analisis*, 1998, 26 (6), M48-M51.
- [32] LARSEN, E.H. Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 1998, 53 (2), 253-265.
- [33] EDLER, M., JAKUBOWSKI, N. y LINSCHIED, M. Styrene oxide DNA adducts: Quantitative determination using  $^{31}\text{P}$  monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 381 (1), 205-211.
- [34] TU, Q., WANG, T., WELCH, C.J., WANG, P., JIA, X., RAAB, C., BU, X., BYKOWSKI, D., HOHENSTAUFEN, B. y DOYLE, M.P. Identification and characterization of isomeric intermediates in a catalyst formation reaction by means of speciation analysis using HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MS. *Analytical Chemistry*, 2006, 78 (4), 1282-1289.
- [35] EDLER, M., JAKUBOWSKI, N. y LINSCHIED, M. Quantitative determination of melphalan DNA adducts using HPLC - Inductively coupled mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 2006, 41 (4), 507-516.
- [36] GIUSTI, P., SCHAUMLÖFFEL, D., RUIZ ENCINAR, J. y SZPUNAR, J. Interfacing reversed-phase nanoHPLC with ICP-MS and on-line isotope dilution analysis for the accurate quantification of selenium-containing peptides in protein tryptic digests. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2005, 20 (10), 1101-1107.
- [37] PEREIRA NAVAZA, A., RUIZ ENCINAR, J., CARRASCAL, M., ABIAN, J. y SANZ-MEDEL, A. Absolute and site-specific quantification of protein phosphorylation using integrated elemental and molecular mass spectrometry: its potential to assess phosphopeptide enrichment procedures. *Analytical Chemistry*, 2008, 80 (5), 1777-1787.
- [38] PEREIRA NAVAZA, A., RUIZ ENCINAR, J. y SANZ-MEDEL, A. Absolute and accurate quantification of protein phosphorylation by using an elemental phosphorus standard and element mass spectrometry. *Angewandte Chemie - International Edition*, 2007, 46 (4), 569-571.
- [39] PRÖFROCK, D. y PRANGE, A. Compensation of gradient related effects when using capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for the absolute quantification of phosphorylated peptides. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216 (39), 6706-6715.

- [40] GREBE, M., PROFROCK, D., KAKUSCHKE, A., BROEKAERT, J.A.C. y PRANGE, A. Absolute quantification of transferrin in blood samples of harbour seals using HPLC-ICP-MS. *Metallomics*, 2011, 3 (2), 176-185.
- [41] BEAUCHEMIN, D. Inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2010, 82 (12), 4786-4810.
- [42] HUANG, Y.F., LI, Y., JIANG, Y. y YAN, X.P. Magnetic immobilization of amine-functionalized magnetite microspheres in a knotted reactor for on-line solid-phase extraction coupled with ICP-MS for speciation analysis of trace chromium. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2010, 25 (9), 1467-1474.
- [43] MORCILLO, Y., CAI, Y. y BAYONA, J.M. Rapid determination of methyltin compounds in aqueous samples using solid phase microextraction and capillary gas chromatography following in-situ derivatization with sodium tetraethylborate. *Journal of High Resolution Chromatography*, 1995, 18 (12), 767-770.
- [44] CAI, Y. y BAYONA, J.M. Determination of methylmercury in fish and river water samples using in situ sodium tetraethylborate derivatization followed by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1995, 696 (1), 113-122.
- [45] AGUERRE, S., LESPES, G., DESAUZIERS, V. y POTIN-GAUTIER, M. Speciation of organotins in environmental samples by SPME-GC: comparison of four specific detectors: FPD, PFPD, MIP-AES and ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, 16 (3), 263-269.
- [46] BIANCHI, F., CARERI, M., MAFFINI, M., MANGIA, A. y MUCCHINO, C. Optimization of the solid phase microextraction procedure for the ultra-trace determination of organotin compounds by gas chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2006, 21 (9), 970-973.
- [47] BELARDI, R.P. y PAWLISZYN, J.B. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollution Research Journal of Canada*, 1989, 24 (1), 179-191.
- [48] ARTHUR, C.L. y PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 1990, 62 (19), 2145-2148.
- [49] CHOU, C.C. y LEE, M.R. Determination of organotin compounds in water by headspace solid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1064 (1), 1-8.
- [50] EL ATI-HELLAL, M., LESPES, G. y DACHRAOUI, M. Determination of organotins in aquatic plants by headspace SPME followed by GC-PFPD determination. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2006, 86 (10), 733-742.
- [51] TUMBILOLO, S., GAL, J.F., MARIA, P.C., LABORDE, P. y TETON, S. Rapid sampling of BTEX in air by SPME in the city of Nice and at the Nice-Cote d'Azur airport. *Pollution Atmospherique*, 2006, 190 185-195.
- [52] SLEZACKOVA, M. y MATISOVA, E. The application of SPME in environmental analysis. *Petroleum and Coal*, 2000, 42 (3-4), 195-201.

- [53] ALPENDURADA, M.F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A*, 2000, 889 (1-2), 3-14.
- [54] SUPELCO. Application note 143: field sampling for pesticides, using solid phase microextraction/capillary GC. Bellefonte, USA: SUPELCO, 1997.
- [55] PEÑALVER HERNANDO, A.M. Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental [Tesis doctoral]. Tarragona: Universitat Rovira i Virgili, Departament de Química Analítica i Química Orgànica, 2002.
- [56] PAWLISZYN, J.B. Solid phase microextraction: theory and practice. New York: Wiley-VCH, 1997. ISBN: 0471190349.
- [57] EISERT, R. y PAWLISZYN, J. New trends in solid-phase microextraction. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 1997, 27 (2), 103-135.
- [58] KATAOKA, H. Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application - a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2002, 373 (1-2), 31-45.
- [59] BRUHEIM, I., LIU, X. y PAWLISZYN, J. Thin-film microextraction. *Analytical Chemistry*, 2003, 75 (4), 1002-1010.
- [60] BRAGG, L., QIN, Z., ALAEE, M. y PAWLISZYN, J. Field sampling with a polydimethylsiloxane thin-film. *Journal of Chromatographic Science*, 2006, 44 (6), 317-323.
- [61] MILLÁN, S., SAMPEDRO, M.C., UNCETA, N., GOICOLEA, M.A., RODRÍGUEZ, E. y BARRIO, R.J. Coupling solid-phase microextraction and high-performance liquid chromatography for direct and sensitive determination of halogenated fungicides in wine. *Journal of Chromatography A*, 2003, 995 (1-2), 135-142.
- [62] SANCHEZ-ORTEGA, A., SAMPEDRO, M.C., UNCETA, N., GOICOLEA, M.A. y BARRIO, R.J. Solid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography using on-line diode-array and electrochemical detection for the determination of fenitrothion and its main metabolites in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1094 (1-2), 70-76.
- [63] LORD, H. y PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, 2000, 885 (1+2), 153-193.
- [64] PAWLISZYN, J. Applications of solid phase microextraction. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1999. ISBN: 9780854045259.
- [65] CHEN, J. y PAWLISZYN, J.B. Solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 1995, 67 (15), 2530-2533.
- [66] RODRIGUEZ, R., MANES, J. y PICO, Y. Off-line solid-phase microextraction and capillary electrophoresis mass spectrometry to determine acidic pesticides in fruits. *Analytical Chemistry*, 2003, 75 (3), 452-459.
- [67] LIU, Z. y PAWLISZYN, J. Online coupling of solid-phase microextraction and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatographic Science*, 2006, 44 (6), 366-375.

- [68] NEGRAO, M.R. y ALPENDURADA, M.F. Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction-high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 1998, 823 (1-2), 211-218.
- [69] ZUCKERMAN, J.J., REISDORF, R.P., ELLIS, H.V. y WILKINSON, R.R. Organotins in biology and the environment. *ACS Symposium Series*, 1978, 82 (Organometals and Organometalloids: Occurrence and Fate in the Environment), 388-424.
- [70] EBDON, L., HILL, S.J. y RIVAS, C. Organotin compounds in solid waste: a review of their properties and determination using high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 1998, 17 (5), 277-288.
- [71] EVANS, C.J. y SMITH, P.J. Organotin-based antifouling systems. *Journal of the Oil and Colour Chemists' Association*, 1975, 58 (5), 160-168.
- [72] CHAMP, M.A. y SELIGMAN, P.F. Organotin- Environmental fate and effects. London: Chapman&Hall, 1996. ISBN: 0412582406.
- [73] SALAZAR, M.H. y SALAZAR, S.M. Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Marine Environmental Research*, 1991, 32 (1-4), 131-150.
- [74] Universidad de Buenos Aires. *Micro Semanario de Educación, Ciencia y Tecnología (Educyt)* [en línea]. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, 2005. [Consulta 20-09-2010]. Disponible en Web: <http://web.fcen.uba.ar/prensa/micro/2005/530/articulo1.html>
- [75] SUZUKI, T., MATSUDA, R. y SAITO, Y. Molecular species of tri-n-butyltin compounds in marine products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40 (8), 1437-1443.
- [76] BRYAN, G.W., GIBBS, P.E., HUMMERSTONE, L.G. y BURT, G.R. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around southwest England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 1986, 66 (3), 611-640.
- [77] FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 1996, 26 (1), 1-117.
- [78] EVANS, S.M. Tributyltin pollution: the catastrophe that never happened. *Marine Pollution Bulletin*, 1999, 38 (8), 629-636.
- [79] EUROPEAN CHEMICAL INDUSTRY COUNCIL. TBT copolymer anti-fouling paints: the facts. 1992.
- [80] CHAMP, M.A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Science of the Total Environment*, 2000, 258 (1-2), 21-71.
- [81] CORNELIS, R., CARUSO, J., CREWS, H. y HEUMANN, K.E. Handbook of elemental speciation, techniques and methodology. Chichester: John Wiley & Sons, 2003. ISBN: 0471492140.
- [82] ASTRUC, A., LAVIGNE, R., DESAUZIERS, V., PINEL, R. y ASTRUC, M. Tributyltin determination in marine sediments: a comparative study of methods. *Applied Organometallic Chemistry*, 1989, 3 (3), 267-271.

- [83] TUTSCHKU, S., MOTHE, S. y WENNRICH, R. Preconcentration and determination of Sn- and Pb-organic species in environmental samples by SPME and GC-AED. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1996, 354 (5-6), 587-591.
- [84] PINEL-RAFFAITIN, P., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P., PONTHEU, M., AMOUROUX, D., LE HECHO, I., MAZEAS, L., DONARD, O.F.X. y POTIN-GAUTIER, M. Determination of alkylated tin compounds in landfill leachates using isotopically enriched tin species with GC-ICP-MS detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2007, 22 (3), 258-266.
- [85] STAB, J.A., COFINO, W.P., VAN HATTUM, B. y BRINKMAN, U.A.T. Comparison of GC/MSD and GC/AED for the determination of organotin compounds in the environment. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1993, 347 (6-7), 247-255.
- [86] KURIHARA, R., RAJENDRAN, R.B., TAO, H., YAMAMOTO, I. y HASHIMOTO, S. Analysis of organotins in seawater of the Southern Ocean and Suruga Bay, Japan, by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2007, 26 (4), 647-654.
- [87] DIAZ-BONE, R.A. y HITZKE, M. Multi-element organometal(loid) speciation by hydride generation-GC-ICP-MS: Overcoming the problem of species-specific optima by using a pH-gradient during derivatisation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2008, 23 (6), 861-870.
- [88] WAHLEN, R. y WOLFF-BRICHE, C. Comparison of GC-ICP-MS and HPLC-ICP-MS for species-specific isotope dilution analysis of tributyltin in sediment after accelerated solvent extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 377 (1), 140-148.
- [89] RUIZ ENCINAR, J. Medida de relaciones isotópicas mediante ICP-MS: aplicaciones analíticas [Tesis doctoral]. Oviedo: Universidad de Oviedo, Departamento de Química Física y Analítica, 2001.
- [90] MACCREHAN, W.A. Differential pulse detection in liquid chromatography and its application to the measurement of organometal cations. *Analytical Chemistry*, 1981, 53 (1), 74-77.
- [91] PRAET, A., DEWAELE, C., VERDONCK, L. y VAN DER KELEN, G.P. Liquid chromatography of organotin compounds on cyanopropyl silica gel. *Journal of Chromatography*, 1990, 507, 427-437.
- [92] BURNS, D.T., GLOCKLING, F. y HARRIOTT, M. Investigation of the determination of tin tetraalkyls and alkyltin chlorides by atomic-absorption spectrometry after separation by gas-liquid or high-performance liquid-liquid chromatography. *Analyst*, 1981, 106 (1266), 921-930.
- [93] LANGSETH, W. Determination of diphenyltin and dialkyltin homologs by HPLC with morin in the eluent. *Talanta*, 1984, 31 (11), 975-978.
- [94] EPLER, K.S., O'HAVER, T.C., TURK, G.C. y MACCREHAN, W.A. Laser-enhanced ionization as a selective detector for the liquid chromatographic determination of alkyltins in sediment. *Analytical Chemistry*, 1988, 60 (19), 2062-2066.
- [95] WALTON, A.P., WEI, G.T., LIANG, Z., MICHEL, R.G. y MORRIS, J.B. Laser-excited atomic fluorescence in a flame as a high-sensitivity detector for organomanganese and organotin compounds following separation by high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 1991, 63 (3), 232-240.

- [96] SUYANI, H., CREED, J., DAVIDSON, T. y CARUSO, J. Inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic emission spectrometry coupled to high-performance liquid chromatography for speciation and detection of organotin compounds. *Journal of Chromatographic Science*, 1989, 27 (3), 139-143.
- [97] RIVARO, P., ZARATIN, L., FRACHE, R. y MAZZUCOTELLI, A. Determination of organotin compounds in marine mussel samples by using high-performance liquid chromatography-hydride generation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analyst*, 1995, 120 (7), 1937-1939.
- [98] INAGAKI, K., TAKATSU, A., WATANABE, T., AOYAGI, Y., YARITA, T., OKAMOTO, K. y CHIBA, K. Certification of butyltins and phenyltins in marine sediment certified reference material by species-specific isotope-dilution mass spectrometric analysis using synthesized  $^{118}\text{Sn}$ -enriched organotin compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387 (7), 2325-2334.
- [99] ROSENBERG, E., KMETOV, V. y GRASSERBAUER, M. Investigating the potential of high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry as an alternative method for the speciation analysis of organotin compounds. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 366 (4), 400-407.
- [100] HOLCAPEK, M., KOLAROVA, L., RUAZICKA, A., JAMBOR, R. y JANDERA, P. Structural analysis of Ionic organotin(IV) compounds using electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2006, 78 (12), 4210-4218.
- [101] JIRASKO, R., HOLCAPEK, M., KOLAROVA, L. y BAUL, T.S.B. Electrospray ionization-multistage tandem mass spectrometry of complex multitin organometallic compounds. *Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 42 (7), 918-928.
- [102] RUIZ ENCINAR, J., MONTERDE VILLAR, M.I., GOTOR SANTAMARÍA, V., GARCÍA ALONSO, J.I. y SANZ-MEDEL, A. Simultaneous determination of mono-, di-, and tributyltin in sediments by isotope dilution analysis using gas chromatography-ICPMS. *Analytical Chemistry*, 2001, 73 (13), 3174-3180.
- [103] RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P., RUIZ ENCINAR, J., GARCÍA ALONSO, J.I. y SANZ-MEDEL, A. Isotope dilution analysis as a definitive tool for the speciation of organotin compounds. *Analyst*, 2003, 128 (5), 447-452.
- [104] RUIZ ENCINAR, J., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P., GARCÍA ALONSO, J.I. y SANZ-MEDEL, A. Evaluation of extraction techniques for the determination of butyltin compounds in sediments using isotope dilution-GC/ICPMS with  $^{118}\text{Sn}$  and  $^{119}\text{Sn}$ -enriched species. *Analytical Chemistry*, 2002, 74 (1), 270-281.
- [105] SUN, J., HE, B., YIN, Y., LI, L. y JIANG, G. Speciation of organotin compounds in environmental samples with semi-permanent coated capillaries by capillary electrophoresis coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Methods*, 2010, 2 (12), 2025-2031.
- [106] YANG, G., XU, J., XU, L., CHEN, G. y FU, F. Analysis of ultratrace triorganotin compounds in aquatic organisms by using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 2010, 80 (5), 1913-1918.

- [107] CAI, Y. y BAYONA, J.M. Simultaneous speciation of butyl-, phenyl-, and cyclohexyltin compounds in aqueous matrixes using ethylation followed by solid-phase trace enrichment, SFE, and GC determination. *Journal of Chromatographic Science*, 1995, 33 (3), 89-97.
- [108] GALLEGO-GALLEGOS, M., LIVA, M., OLIVAS RIANSAIRES, M. y CÁMARA, C. Focused ultrasound and molecularly imprinted polymers: a new approach to organotin analysis in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1114 (1), 82-88.
- [109] GALLEGO-GALLEGOS, M., GARRIDO, M.L., OLIVAS, R.M., BARAVALLE, P., BAGGIANI, C. y CÁMARA, C. A new application of imprinted polymers: Speciation of organotin compounds. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217 (20), 3400-3407.
- [110] BIRJANDI, A.P., BIDARI, A., REZAEI, F., HOSSEINI, M.R.M. y ASSADI, Y. Speciation of butyl and phenyltin compounds using dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1193 (1-2), 19-25.
- [111] DIEZ, S. y BAYONA, J.M. Trace element determination by combining solid-phase microextraction hyphenated to elemental and molecular detection techniques. *Journal of Chromatographic Science*, 2006, 44 (7), 458-471.
- [112] WU, J., MESTER, Z. y PAWLISZYN, J. Determination of tributyltin by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC-ES-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, 16 (2), 159-165.
- [113] GBATU, T.P., SUTTON, K.L. y CARUSO, J.A. Development of new SPME fibers by sol-gel technology for SPME-HPLC determination of organometals. *Analytica Chimica Acta*, 1999, 402 (1-2), 67-79.
- [114] MESTER, Z., STURGEON, R.E., LAM, J.W., MAXWELL, P.S. y PETER, L. Speciation without chromatography. Part I. Determination of tributyltin in aqueous samples by chloride generation, headspace solid-phase microextraction and inductively coupled plasma time of flight mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, 16 (11), 1313-1316.
- [115] MESTER, Z. y STURGEON, R. Trace element speciation using solid phase microextraction. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2005, 60B (9-10), 1243-1269.
- [116] BANCON-MONTIGNY, C., MAXWELL, P., YANG, L., MESTER, Z. y STURGEON, R.E. Improvement of measurement precision of SPME-GC/MS determination of tributyltin using isotope dilution calibration. *Analytical Chemistry*, 2002, 74 (21), 5606-5613.
- [117] BECEIRO-GONZÁLEZ, E., GUIMARAES, A. y ALPENDURADA, M.F. Optimisation of a headspace-solid-phase micro-extraction method for simultaneous determination of organometallic compounds of mercury, lead and tin in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216 (29), 5563-5569.
- [118] CHAFER PERICAS, M.C., MESEGUER LLORET, S., TORRES CARTAS, S. y RODILLA ALAMA, M. Determining organotin compounds in marine water and sediment samples using HS-SPME-GC-FID. *LC-GC Europe*, 2009, 22 (10), 506, 508-513.
- [119] MONTES, R., CANOSA, P., LAMAS, J.P., PIÑEIRO, A., ORRIOLS, I., CELA, R. y RODRÍGUEZ, I. Matrix solid-phase dispersion and solid-phase microextraction applied to study

the distribution of fenbutatin oxide in grapes and white wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 395 (8), 2601-2610.

[120] ZACHARIADIS, G.A. y ROSENBERG, E. Determination of butyl- and phenyltin compounds in human urine by HS-SPME after derivatization with tetraethylborate and subsequent determination by capillary GC with microwave-induced plasma atomic emission and mass spectrometric detection. *Talanta*, 2009, 78 (2), 570-576.

[121] CANOSA, P., MONTES, R., LAMAS, J.P., GARCÍA-LÓPEZ, M., ORRIOLS, I. y RODRÍGUEZ, I. Pressurized liquid extraction followed by gas chromatography with atomic emission detection for the determination of fenbutatin oxide in soil samples. *Talanta*, 2009, 79 (3), 598-602.

[122] ZHAI, G., LIU, J., LI, L., CUI, L., HE, B., ZHOU, Q. y JIANG, G. Rapid and direct speciation of methyltins in seawater by an on-line coupled high performance liquid chromatography-hydride generation-ICP/MS system. *Talanta*, 2009, 77 (4), 1273-1278.

[123] PRIETO, A., ZULOAGA, O., USOBIAGA, A., ETXEBARRIA, N., FERNÁNDEZ, L.A., MARCIC, C. y DE DIEGO, A. Simultaneous speciation of methylmercury and butyltin species in environmental samples by headspace-stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1185 (1), 130-138.

[124] XIAO, Q., HU, B. y HE, M. Speciation of butyltin compounds in environmental and biological samples using headspace single drop microextraction coupled with gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1211 (1-2), 135-141.

[125] HEROULT, J., BUENO, M., POTIN-GAUTIER, M. y LESPES, G. Organotin speciation in French brandies and wines by solid-phase microextraction and gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1180 (1-2), 122-130.

[126] DELGADO, A., USOBIAGA, A., PRIETO, A., ZULOAGA, O., DE DIEGO, A. y MADARIAGA, J.M. Optimisation of the headspace-solid phase microextraction for organomercury and organotin compound determination in sediment and biota. *Journal of Separation Science*, 2008, 31 (4), 768-774.

[127] WANG, X., JIN, H., DING, L., ZHANG, H., ZHANG, H., QU, C. y YU, A. Organotin speciation in textile and plastics by microwave-assisted extraction HPLC-ESI-MS. *Talanta*, 2008, 75 (2), 556-563.

[128] PINEL-RAFFAITIN, P., AMOUROUX, D., LEHECHO, I., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P. y POTIN-GAUTIER, M. Occurrence and distribution of organotin compounds in leachates and biogases from municipal landfills. *Water Research*, 2008, 42 (4-5), 987-996.

[129] POINT, D., DAVIS, W.C., CHRISTOPHER, S.J., ELLISOR, M.B., PUGH, R.S., BECKER, P.R., DONARD, O.F.X., PORTER, B.J. y WISE, S.A. Development and application of an ultratrace method for speciation of organotin compounds in cryogenically archived and homogenized biological materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387 (7), 2343-2355.

[130] ÜVEGES, M., RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P., GARCÍA ALONSO, J.I., SANZ-MEDEL, A. y FODOR, P. Isotope dilution analysis mass spectrometry for the routine measurement of butyltin



compounds in marine environmental and biological samples. *Microchemical Journal*, 2007, 85 (1), 115-121.

[131] TANG, C.H. y WANG, W.H. Optimization of an analytical method for determining organotin compounds in fish tissue by base-hydrolysis pretreatment and simultaneous ethylation-extraction procedures. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 581 (2), 370-376.

[132] WANG, X., DING, L., ZHANG, H., CHENG, J., YU, A., ZHANG, H., LIU, L., LIU, Z. y LI, Y. Development of an analytical method for organotin compounds in fortified flour samples using microwave-assisted extraction and normal-phase HPLC with UV detection. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2006, 843 (2), 268-274.

[133] RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P., RUIZ ENCINAR, J., GARCÍA ALONSO, J.I. y SANZ-MEDEL, A. Contamination of the coastal waters of Gijon (North west Spain) by butyltin compounds. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2006, 174 (1-4), 127-139.

[134] SERRA, H. y NOGUEIRA, J.M.F. Organotin speciation in environmental matrices by automated on-line hydride generation-programmed temperature vaporization-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1094 (1-2), 130-137.

[135] MZOUGH, N., LESPE, G., BRAVO, M., DACHRAOUI, M. y POTIN-GAUTIER, M. Organotin speciation in Bizerte lagoon (Tunisia). *Science of the Total Environment*, 2005, 349 (1-3), 211-222.

[136] FERNANDEZ, M.A., DE LUCA REBELLO WAGENER, A., LIMAVARDE, A.M., SCOFIELD, A.L., PINHEIRO, F.M. y RODRIGUES, E. Imposex and surface sediment speciation: a combined approach to evaluate organotin contamination in Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Marine Environmental Research*, 2005, 59 (5), 435-452.

[137] DEVOS, C., VLEGEM, M., WILLAERT, B., DAVID, F., MOENS, L. y SANDRA, P. Automated headspace-solid-phase microextraction-retention time locked-isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of organotin compounds in water and sediment samples. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1079 (1-2), 408-414.

[138] CAMPILLO, N., AGUINAGA, N., VINAS, P., LÓPEZ-GARCÍA, I. y HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Speciation of organotin compounds in waters and marine sediments using purge-and-trap capillary gas chromatography with atomic emission detection. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 525 (2), 273-280.

[139] CUKROWSKA, E., CHIMUKA, L., NSENGIMANA, H. y KWARAMBA, V. Application of supported liquid membrane probe for extraction and preconcentration of organotin compounds from environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*, 2004, 523 (1), 141-147.

[140] HUANG, J.H. y MATZNER, E. Biogeochemistry of organotin compounds and tin in a forested catchment in Germany. *Science of the Total Environment*, 2004, 332 (1-3), 231-241.

[141] JIANG, G.-B., LIU, J.-Y. y ZHOU, Q.-F. Search for the contamination source of butyltin compounds in wine: agglomerated cork stoppers. *Environmental Science and Technology*, 2004, 38 (16), 4349-4352.

- [142] MUÑOZ, J., BAENA, J.R., GALLEGRO, M. y VALCARCEL, M. Speciation of butyltin compounds in marine sediments by preconcentration on C60 and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1023 (2), 175-181.
- [143] JONES-LEPP, T.L., VARNER, K.E. y HEGGEM, D. Monitoring dibutyltin and triphenyltin in fresh waters and fish in the United States using micro-liquid chromatography-electrospray/ion trap mass spectrometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 46 (1), 90-95.
- [144] VIÑAS, P., LÓPEZ-GARCÍA, I., MERINO-MERONO, B., CAMPILLO, N. y HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Liquid chromatography-hydride generation-atomic absorption spectrometry for the speciation of tin in seafoods. *Journal of Environmental Monitoring*, 2004, 6 (4), 262-266.
- [145] JITARU, P., GOENAGA INFANTE, H. y ADAMS, F.C. Simultaneous multi-elemental speciation analysis of organometallic compounds by solid-phase microextraction and multicapillary gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, 19 (7), 867-875.
- [146] CENTINEO, G., BLANCO GONZÁLEZ, E. y SANZ-MEDEL, A. Multielemental speciation analysis of organometallic compounds of mercury, lead and tin in natural water samples by headspace-solid phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1034 (1-2), 191-197.
- [147] LE GAC, M., LESPES, G. y POTIN-GAUTIER, M. Rapid determination of organotin compounds by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 2003, 999 (1-2), 123-134.
- [148] WAHLEN, R. y CATTERICK, T. Comparison of different liquid chromatography conditions for the separation and analysis of organotin compounds in mussel and oyster tissue by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2003, 783 (1), 221-229.
- [149] GONZÁLEZ-TOLEDO, E., BENZI, M., COMPAÑÓ, R., GRANADOS, M. y PRAT, M.D. Speciation of organotin compounds in shellfish by liquid chromatography - fluorometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 443 (2), 183-190.
- [150] CHIRON, S., ROY, S., COTTIER, R. y JEANNOT, R. Speciation of butyl- and phenyltin compounds in sediments using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2000, 879 (2), 137-145.
- [151] JIANG, G.B., LIU, J.Y. y YANG, K.W. Speciation analysis of butyltin compounds in Chinese seawater by capillary gas chromatography with flame photometric detection using in-situ hydride derivatization followed by headspace solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 2000, 421 (1), 67-74.
- [152] MILLÁN, E. y PAWLISZYN, J. Determination of butyltin species in water and sediment by solid-phase microextraction-gas chromatography-flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 2000, 873 (1), 63-71.
- [153] TOBIAS, R.S., FARRER, H.N., HUGHES, M.B. y NEVETT, B.A. Hydrolysis of the aquo ions  $R_3Sn^+$  and  $R_2Sn^{2+}$ : steric effects on the dissociation of aquo acids. *Inorganic Chemistry*, 1966, 5 (11), 2052-2055.

- [154] ARNOLD, C.G., WEIDENHAUPT, A., DAVID, M.M., MUELLER, S.R., HADERLEIN, S.B. y SCHWARZENBACH, R.P. Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environmental Science and Technology*, 1997, 31 (9), 2596-2602.
- [155] WEIDENHAUPT, A.N.J. Trialkyltin compounds: speciation in octanol/water system, sorption to mineral surfaces [Tesis doctoral]. Zurich: ETH Zurich, 1995.
- [156] GARCÍA ALONSO, J.I., SANZ-MEDEL, A. y EBDON, L. Determination of butyltin ion species by ion-exchange chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and spectrofluorimetric detection. *Analytica Chimica Acta*, 1993, 283 (1), 261-271.
- [157] ROSMAN, K.J.R. y TAYLOR, P.D.P. Isotopic compositions of the elements, 1997. *Pure and Applied Chemistry*, 1998, 70 (1), 217-235.
- [158] CHAO, W.S. y JIANG, S.J. Determination of organotin compounds by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with a direct injection nebulizer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1998, 13 (12), 1337-1341.
- [159] MARK, H.B., JR., CEYLAN, O., GBATU, T., SUTTON, K., RUBINSON, J.F., CARUSO, J.A. y GALAL, A. Solid phase micro-extraction of anions of environmental interest: application of conducting polymer micro-fiber electrodes for injection system for HPLC and FIA. *Proceedings - Electrochemical Society*, 2001, 2001-18 (Chemical and Biological Sensors and Analytical Methods II), 239-244.
- [160] YATES, B.J., TEMSAMANI, K.R., CEYLAN, O., OZTEMIZ, S., GBATU, T.P., LARUE, R.A., TAMER, U. y MARK, H.B. Electrochemical control of solid phase micro-extraction: conducting polymer coated film material applicable for preconcentration/analysis of neutral species. *Talanta*, 2002, 58 (4), 739-745.
- [161] TAMER, U., YATES, B., GALAL, A., GBATU, T., LARUE, R., SCHMIESING, C., TEMSAMANI, K., CEYLAN, O. y MARK, H.B., JR. Electrochemically aided control of solid phase micro-extraction (EASPM) using conducting polymer-coated solid substrates. Applicable to neutral analytes. *Microchimica Acta*, 2003, 143 (2-3), 205-215.
- [162] SAMPEDRO, M.C., MARTÍN, O., LÓPEZ DE ARMENTIA, C., GOICOLEA, M.A., RODRÍGUEZ, E., GÓMEZ DE BALUGERA, Z., COSTA-MOREIRA, J. y BARRIO, R.J. Solid-phase microextraction for the determination of systemic and non-volatile pesticides in river water using gas chromatography with nitrogen-phosphorous and electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 2000, 893 (2), 347-358.
- [163] MALIK, A.K., KAUR, V. y VERMA, N. A review on solid phase microextraction-high performance liquid chromatography as a novel tool for the analysis of toxic metal ions. *Talanta*, 2006, 68 (3), 842-849.
- [164] HUANG, J.H., ILGEN, G. y MATZNER, E. Simultaneous extraction of organotin, organolead and organomercury species from soils and litter. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 493 (1), 23-34.
- [165] DE MORA, S.J., FOWLER, S.W., CASSI, R. y TOLOSA, I. Assessment of organotin contamination in marine sediments and biota from the Gulf and adjacent region. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46 (4), 401-409.

[166] FREISER, H. y NANCOLLAS, G.H. Compendium of analytical nomenclature: Definitive Rules 1987. 2nd Ed. International Union of Pure and Applied Chemistry. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1987. ISBN: 0632019077.

[167] VALCARCEL, M. Principles of analytical chemistry: a textbook. Berlin: Springer-Verlag, 2000. ISBN: 354064007X.

[168] COMPAÑÓ, R. y RIOS, A. Garantía de calidad en los laboratorios analíticos. Madrid: Editorial Síntesis, 2003. ISBN: 9788497560245.

[169] KNOLL, J.E. Estimation of the limit of detection in chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 1985, 23 (9), 422-425.

[170] European Commission. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No SANCO/10684/2009. 2010.

[171] RAHMI, D., ZHU, Y., FUJIMORI, E., UMEMURA, T. y HARAGUCHI, H. Multielement determination of trace metals in seawater by ICP-MS with aid of down-sized chelating resin-packed minicolumn for preconcentration. *Talanta*, 2007, 72 (2), 600-606.

4. Desarrollo de patrones de calibración de HAp  
para LA-ICP-MS: Aplicación a muestras de espina  
de tñidos

---





## 4.1. Introducción

La determinación de elementos químicos a nivel de trazas en muestras sólidas constituye hoy en día un desafío analítico en numerosos ámbitos, como son la geología, la investigación judicial, la metalurgia o los estudios ambientales, entre otros. Entre las diferentes técnicas de análisis (directo o indirecto) que pueden utilizarse, la ablación láser acoplada a ICP-MS aparece como una herramienta consolidada que permite, a priori, analizar directamente cualquier tipo de muestra sólida sin preparación de la misma. Se elimina por tanto el riesgo de contaminación, al tiempo que se reduce la duración del análisis.

Una de las aplicaciones ambientales de esta técnica es el estudio de la distribución espacial de elementos traza en estructuras calcificadas, como otolitos o corales. Sin embargo, estos estudios se han centrado en matrices de carbonato cálcico y su aplicación a matrices fosfatadas como espinas o huesos se ha visto limitada por la ausencia de patrones adecuados. Este capítulo describe la metodología empleada para la validación de una serie de patrones sólidos de hidroxapatito (HAp) enriquecidos para ser utilizados como estándares de calibración en matriz (*matrix-matching standards*) en LA-ICP-MS. Como ejemplo de su aplicabilidad, se propone su utilización para realizar el análisis cuantitativo de elementos traza en la primera espina de la primera aleta dorsal de túnidos. El interés de esta estructura radica en que presenta anillos de crecimiento, y podría ser por ello potencialmente utilizada como indicador de contaminación ambiental. Se recogen asimismo los estudios previos llevados a cabo para evaluar el contenido de metales en estas estructuras y en tejido muscular de estos organismos acuáticos por ICP-MS en disolución.

A continuación se detallan las principales características de la ablación láser acoplada a ICP-MS y su aplicación a la determinación de elementos traza en tejidos biomineralizados. Igualmente se describen aspectos relacionados con la primera espina de la primera aleta dorsal de túnidos.

#### 4.1.1. Ablación láser acoplada a ICP-MS para el análisis de muestras sólidas

La combinación de ablación láser e ICP-MS constituye una importante técnica para el análisis directo de muestras sólidas. Desde su introducción en 1985 por Gray<sup>1</sup>, se han descrito numerosas aplicaciones, especialmente en aquellos campos donde se requiere elevada resolución espacial y sensibilidad<sup>2</sup>. Desde entonces, el principio fundamental de la técnica no ha cambiado. Un pulso de láser corto y de elevada energía incide sobre la superficie de la muestra en una atmósfera inerte (Ar o He) a presión atmosférica, dentro de una cámara de ablación cerrada herméticamente. Si la irradiancia (potencia incidente por unidad de superficie) es suficientemente alta, el haz de láser desprenderá partículas, átomos, iones y electrones de la superficie de la muestra, que serán transportados al ICP-MS por medio de un gas portador que fluye por la cámara de ablación, donde el aerosol generado será vaporizado, atomizado e ionizado en el plasma. Finalmente, los iones cargados positivamente podrán ser analizados utilizando diferentes tipos de analizadores de masas (cuadrupolo, tiempo de vuelo o sector magnético)<sup>3, 4</sup>.

##### 4.1.1.1. Comparación con análisis en disolución por ICP-MS

Si se compara con las técnicas habituales de análisis por vía húmeda, la ablación láser presenta considerables ventajas<sup>5</sup>. La mayoría de las técnicas de análisis elemental requieren la digestión de la muestra sólida en una disolución ácida (HNO<sub>3</sub>, HCl, HF, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etc.). Esto habitualmente exige invertir tiempo en procesos de varias etapas, empleando reactivos peligrosos y aumentando el riesgo de contaminación y pérdida de analitos volátiles. El análisis directo del sólido, en cambio, reduce el tiempo de análisis así como el riesgo de contaminación y de pérdidas de analitos, ya que no se requiere



ningún tratamiento de muestra. Mediante ablación láser puede ser analizada cualquier tipo de muestra: conductora, no conductora, dura o blanda. Las muestras simplemente han de cumplir dos requisitos; deben permanecer en una forma estable (por ejemplo como sólidos, como polvo prensado o congeladas<sup>6</sup>) y tienen que poder ser alojadas en la cámara de ablación. El análisis mediante ablación láser requiere generalmente una menor cantidad de muestra que la exigida para el análisis en disolución. Además, la utilización de un haz de láser focalizado como procedimiento de micro-muestreo permite la caracterización espacial de la heterogeneidad de la muestra sólida, típicamente con una resolución micrométrica tanto lateral como en profundidad. (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Comparación de las prestaciones de ICP-MS y LA-ICP-MS para el análisis de muestras sólidas<sup>7, 8</sup>.

	ICP-MS	LA-ICP-MS
<b>Preparación de muestra</b>	Habitualmente simple	Pequeña o inexistente
<b>Cuantificación</b>	Excelente	Difícil, se requieren patrones sólidos
<b>Límites de detección</b>	0.001- 0.1 pg mL <sup>-1</sup> (disoluciones)	0.0001- 0.1 µg g <sup>-1</sup> (sólidos)
<b>Precisión (elementos traza)</b>	± 1- 5 %	± 1- 10 %
<b>Resolución espacial del análisis</b>	No	Resolución lateral > 5 µm
<b>Caracterización en profundidad de capas</b>	No	0.02- 9 µm
<b>Etaa más laboriosa (tiempo)</b>	Preparación de muestra	Cuantificación
<b>Riesgo de contaminación</b>	Alto	Bajo
<b>Limitaciones</b>	Interferencias	Interferencias, heterogeneidad

#### 4.1.1.2. Principios e instrumentación

La configuración general del sistema LA-ICP-MS formado por el láser, la plataforma de ablación y el sistema de detección (ICP-MS), no ha variado significativamente en los últimos años (Figura 4.1).

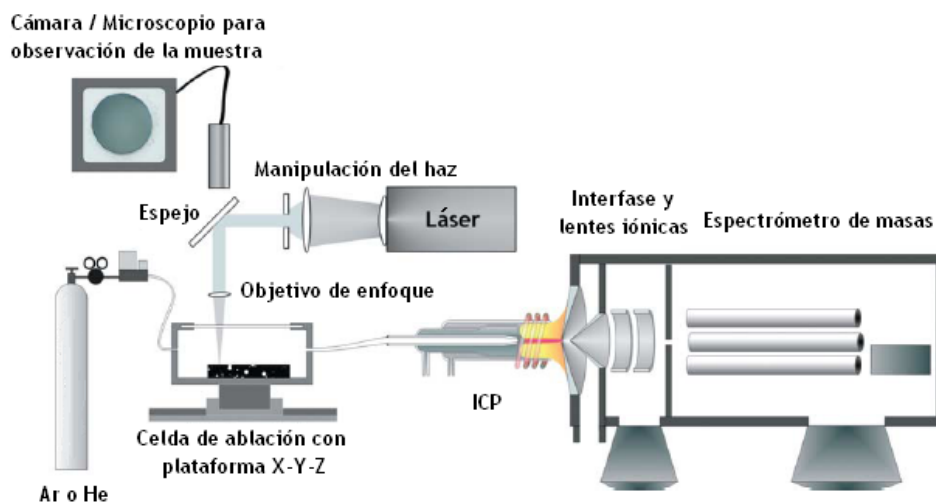


Figura 4.1. Representación esquemática del sistema LA-ICP-MS<sup>9</sup>.

#### *Tipos de láseres*

Desde su comercialización a principios de los 80, se han utilizado diferentes tipos de láseres y longitudes de onda. Los láseres de rubí e IR utilizados en los comienzos de la ablación láser ICP-OES/MS fueron sustituidos enseguida por láseres de longitudes de onda inferiores, que dieron lugar a sistemas de ablación de 193 nm<sup>10</sup> y 157 nm<sup>11</sup>. En general, a menor longitud de onda se obtiene una mejor interacción láser-materia, partículas de aerosol más finas y una mayor eficiencia en el transporte, así como una reducción del fraccionamiento elemental<sup>12-17</sup>, que como se verá a continuación consiste en la ausencia de representatividad en cuanto a la composición elemental e isotópica del aerosol con respecto a la muestra.

Además de la longitud de onda del láser, la duración del pulso constituye otro importante parámetro a considerar. Los láseres de nanosegundos (ns) son instrumentos

robustos con alta energía de salida, con varias longitudes de onda disponibles y coste razonable. Sin embargo, duraciones de pulso del orden de los pico- (ps) o femtosegundos (fs) hacen que el proceso de ablación láser sea menos térmico y pueden reducir por ello el fraccionamiento elemental inducido por el láser<sup>18</sup>, especialmente para el análisis de ciertas muestras metálicas. Una restricción de los láseres fs es la relativamente baja energía de salida, de unos pocos mJ por pulso. Para longitudes de onda del UV, se utilizan el 3<sup>er</sup> y 4<sup>o</sup> armónico de la longitud de onda original (normalmente entorno a 800 nm), lo que reduce aún más la energía disponible. Sin embargo, debido a la corta duración del pulso, las densidades de potencia alcanzables son muy superiores para los láseres fs en comparación con los de ns, lo que puede ser crucial para el análisis de muestras metálicas. En la Tabla 4.2 se recoge un resumen de las características de los láseres utilizados para LA-ICP-MS.

Tabla 4.2. Resumen de las características de los láseres utilizados para ablación con ICP-MS. (Adaptado de Günther y Hattendorf<sup>9</sup> y Claverie<sup>8</sup>)

Láser	Carácter	$\lambda$ (nm)	Duración del pulso	Año de la primera referencia
Rubí	Estado sólido	694	ns	1985 <sup>1</sup>
Nd:YAG	Estado sólido	1064	ns	1992 <sup>19</sup>
Nd:YAG	Estado sólido, 4 <sup>o</sup> armónico	266	ns	1993 <sup>20</sup>
ArF	Gas excímero	193	ns	1995 <sup>21</sup>
KrF	Gas excímero	248	ns	1996 <sup>22</sup>
Nd:YAG	Estado sólido, 2 <sup>o</sup> armónico	532	ns	1997 <sup>23</sup>
XeCl	Gas excímero	308	ns	1997 <sup>24</sup>
Nd:YAG	Estado sólido, 5 <sup>o</sup> armónico	213	ns	1998 <sup>25</sup>
Ti:Zafiro	Estado sólido	≈800	fs	2002 <sup>26</sup>
F <sub>2</sub>	Gas excímero	157	ns	2003 <sup>11</sup>
Nd:YAG	Estado sólido (OPO)	193	ns	2003 <sup>27</sup>
Ti:Zafiro	Estado sólido	≈260	fs	2003 <sup>28</sup>
Yb -KGW	Estado sólido	1030	fs	2005 <sup>29</sup>
Ti:Zafiro	Estado sólido	196	fs	2006 <sup>30</sup>
Ti:Zafiro	Estado sólido	795	fs	2006 <sup>31</sup>

## *Óptica*

La aplicación de diferentes técnicas ópticas ha permitido mejorar significativamente la homogeneidad de la densidad de energía del láser en la superficie de la muestra<sup>9</sup>. Una distribución de energía con perfil plano (*flat-top*) a lo largo del punto de ablación garantiza que el desprendimiento de muestra sea idéntico en toda la superficie de ese punto. El filtrado espacial utilizando aberturas o una serie de lentes ópticas en combinación con una abertura, son procedimientos comunes para homogeneizar los perfiles del haz del láser<sup>10, 32, 33</sup>. El haz del láser homogeneizado es ventajoso también para los análisis de perfiles en profundidad<sup>34</sup>.

## *Celdas de ablación*

Existen numerosos diseños de celdas de ablación que difieren principalmente en su volumen interno (0.25 - 100 cm<sup>3</sup>). Se han llevado a cabo varios estudios para mejorar la eficiencia en el transporte de la muestra ablacionada que se ha estimado en un 10 - 20%<sup>35, 36</sup> y 40%<sup>37, 38</sup>. La eficiencia relativa en el transporte de diferentes celdas de ablación y tubos de transferencia, medida como la intensidad de la señal en LA-ICP-MS, no cambia significativamente para diferentes volúmenes de celda y tubo<sup>39</sup>. No obstante, se ha demostrado que el volumen de la celda de ablación afecta principalmente a la dispersión de la señal y con ello a la magnitud de la relación señal/ruido.

### 4.1.1.3. Fraccionamiento elemental

El fraccionamiento elemental es una de las principales limitaciones de la LA-ICP-MS, y básicamente de todas las técnicas de muestreo basadas en láser. Este término describe el conjunto de efectos no-estequiométricos que ocurren en las señales transientes<sup>40</sup>. Todos los procesos involucrados en la LA-ICP-MS (el proceso de formación del aerosol, su transporte y posterior conversión en iones en el ICP) pueden potencialmente alterar la composición estequiométrica del aerosol generado por el láser dependiendo de las propiedades químicas y físicas de los elementos, contribuyendo a los efectos de fraccionamiento elemental o isotópico<sup>41-43</sup>.

Así, se han descrito tres tipos diferentes de fraccionamiento inducido por láser:

- Fraccionamiento por la evaporación preferente de elementos volátiles en el gas portador<sup>23</sup>.
- Fraccionamiento elemental relacionado con el tamaño de las partículas<sup>44</sup>.
- Fraccionamiento isotópico inducido por el láser<sup>45</sup>.

Puesto que todos los procesos son sucesivos pero generan una única señal, las contribuciones individuales son difíciles de distinguir.

Los parámetros experimentales empleados en el proceso de ablación láser determinan la cantidad, la composición y la distribución por tamaños de las partículas del aerosol generadas para una muestra dada, por lo que la influencia de estos parámetros ha sido ampliamente investigada en los últimos años para entender mejor y minimizar las limitaciones de la LA-ICP-MS<sup>4</sup>. La mayor parte del trabajo realizado hasta la fecha se ha centrado en las longitudes de onda (IR *versus* UV), la duración del pulso (ns *versus* fs), el gas portador de la ablación láser (Ar *versus* He o Ne) y el diseño de la celda de ablación como parámetros más relevantes en la formación del aerosol<sup>46</sup>. Aunque no se han realizado cambios significativos en la fuente de iones ICP, los nuevos desarrollos instrumentales dados tanto en la parte del MS como en el láser han dado lugar a nuevas aplicaciones. Los desarrollos llevados a cabo en el láser se han dirigido básicamente en dos direcciones: longitudes de onda menores y pulsos más cortos<sup>28</sup>. Con ello se persigue conseguir una utilización de la energía del pulso del láser emitida a la superficie de la muestra más eficiente y definida para la generación de un aerosol estequiométrico.

Los parámetros del láser como la fluencia (energía del láser por unidad de área), duración del pulso y longitud de onda definen el tamaño, la distribución por tamaños y la composición de las partículas ablacionadas<sup>47, 48</sup>. Teniendo en cuenta que el rendimiento analítico de la ablación láser acoplada a ICP-MS se ve significativamente influenciado por estas características del aerosol, para cada aplicación específica será necesaria una optimización cuidadosa de las condiciones experimentales para obtener resultados analíticos exactos y precisos.

En cualquier caso, las mencionadas inexactitudes relacionadas con el fraccionamiento elemental se pueden evitar ampliamente si se utilizan para la calibración patrones (preferiblemente CRMs) cuya composición y morfología sea similar a la de la muestra (conocidos como *matrix-matching standards*, empleados en la calibración del mismo nombre).

#### 4.1.1.4. Estrategias de calibración en LA-ICP-MS

La ablación láser en combinación con ICP-MS es una potente técnica para determinar elementos mayoritarios, traza y ultra-traza en muestras sólidas, como se recoge en la Tabla 4.1. Sin embargo, la obtención de resultados cuantitativos por LA-ICP-MS es un proceso laborioso. Así como en los análisis en disolución normalmente se añaden uno o varios patrones internos para corregir variaciones en el sistema de introducción de muestra, en la estabilidad del plasma, en la deriva del instrumento o en efecto matriz, en el caso de muestras sólidas es difícil añadir un patrón interno. Además, la ablación de la muestra, su transporte y la ionización en el ICP dependen significativamente de la posición de la muestra en la cámara de ablación, la matriz de la muestra, la longitud de onda del láser, el gas portador y las condiciones de operación del ICP. Así, los análisis cuantitativos constituyen todavía un reto en el caso de numerosas muestras sólidas<sup>5</sup>. No existe un método universal de calibración que sea aplicable a todos los tipos de muestras.

Hasta la fecha, la determinación de la concentración de analitos por LA-ICP-MS se ha basado principalmente en materiales de referencia de vidrios (como los de la serie 61X del NIST) utilizados como patrones sólidos de calibración externa. El procedimiento para la cuantificación fue descrito en detalle por Longerich y cols.<sup>49</sup>. Puesto que los materiales de referencia disponibles no cubren todos los tipos de muestras, muchos laboratorios preparan patrones sintéticos similares a las muestras para aplicaciones específicas<sup>50-52</sup>. Igualmente, se ha utilizado la combinación de la nebulización de disoluciones patrón (con<sup>53</sup> o sin<sup>54, 55</sup> unidades de desolvatación) con ablación láser o la ablación directa de líquidos<sup>56</sup>. Todos estos métodos de calibración se basan en la

estandarización interna. Asimismo, cabe destacar que la utilización de la Dilución Isotópica (ID) en combinación con LA-ICP-MS permite el análisis cuantitativo exacto, preciso y eficiente de elementos traza en muestras pulverizadas utilizando diferentes estrategias de calibración, como son la ID en línea<sup>57</sup>, ID dopando con sólidos<sup>58, 59</sup> e ID en celda<sup>60</sup>. Con este método de calibración, siempre que se consiga una distribución homogénea del trazador isotópicamente enriquecido y del analito, los resultados analíticos no se ven afectados por la deriva de la señal, los efectos de matriz o las pérdidas de analito y su aplicación en LA-ICP-MS corrige efectos comunes de fraccionamiento que no pueden controlarse utilizando otras estrategias. Sin embargo, la LA-ICP-IDMS no es aplicable a muestras sólidas compactas ni a los elementos monoisotópicos y además, los trazadores son caros.

Según Vogt y Latkoczy<sup>61</sup>, para una cuantificación exitosa de elementos en muestras sólidas mediante LA-ICP-MS, el método debe cumplir tres criterios:

- Que se conozca la cantidad exacta de muestra transportada al ICP.
- Que la composición del aerosol generado por el láser represente la estequiometría de la muestra original, o, de presentarse una desviación, que ésta se dé en el mismo grado en patrones de calibración y muestras.
- Que las partículas transportadas al ICP sean completamente atomizadas e ionizadas en el plasma, siendo el grado de ionización para un elemento idéntico tanto en patrones de calibración como en muestras<sup>62</sup>.

En cuanto a la primera premisa, conocer la cantidad de muestra transportada al ICP-MS es muy poco común, incluso para muestras de composición uniforme<sup>35</sup>. Si las muestras tienen composición similar, se puede esperar que el pulso del láser ablaque la misma cantidad de material. Sin embargo, incluso cuando se utilizan patrones de calibración cuya matriz es muy similar a la de las muestras (*matrix-matching standards*), patrones y muestras presentan generalmente tasas de ablación diferentes. Para evitar este problema, se utiliza un patrón interno, habitualmente un isótopo minoritario de un elemento mayoritario distribuido homogéneamente en la muestra, lo que mejora significativamente la calidad de los datos obtenidos<sup>19, 63, 64</sup>. La concentración del

elemento utilizado como patrón interno debe conocerse antes del análisis por LA-ICP-MS mediante técnicas complementarias.

No obstante, que la composición del aerosol sea estequiométrica sigue siendo crucial para un análisis cuantitativo exitoso por LA-ICP-MS. Cuando se utiliza un patrón interno para compensar los cambios en la tasa de ablación y en la eficiencia en el transporte de muestra, éste tiene que mostrar un comportamiento semejante al de los analitos. Igualmente, cabe mencionar que una absortividad similar de patrones y muestras no sólo proporcionará una distribución por tamaños similar de las partículas ablacionadas, sino que también una carga másica similar del plasma, evitando así una fuente de fraccionamiento<sup>2</sup>.

En cuanto a la completa vaporización, atomización e ionización, se requiere una fuente de iones ICP con suficiente energía. La eficiencia de ionización depende del tiempo de residencia de los átomos en el ICP, por lo que ésta puede lograrse cuando la atomización se completa en una etapa inicial del plasma.

#### 4.1.1.5. Efectos del gas portador

En ablación láser la función del gas portador es, ante todo, la de transportar las partículas del aerosol generadas al ICP. Así, la elección del gas portador determina, no sólo las condiciones de ionización del plasma ICP, también las del microplasma generado por el láser en la superficie de la muestra, así como el transporte de las partículas. En LA-ICP-MS se utilizan generalmente He y/o Ar a presión atmosférica como gases portadores. En 1998 Eggins y cols.<sup>65</sup> fueron los primeros en observar la influencia del He como gas portador y el consiguiente cambio en la distribución por tamaños de las partículas generadas y en la sensibilidad. Los autores observaron un aumento de entre 2 y 4 veces en la intensidad de la señal en el ICP-MS y una reducción en el material depositado en el entorno de la zona de ablación al ablacionar en una atmósfera de He en lugar de Ar con un láser excímero de ArF de 193 nm. En 1999 Günther y Heinrich<sup>66</sup> observaron los mismos fenómenos al estudiar diferentes mezclas



de Ar/ He. La ausencia de partículas grandes en la superficie de la muestra ablacionada (Figura 4.2) ha sido constatada posteriormente en diversos trabajos<sup>44, 67, 68</sup>.

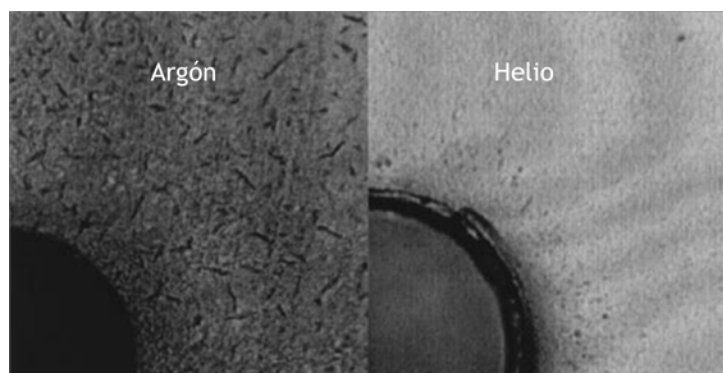


Figura 4.2. Detalle de dos cráteres ablacionados en un vidrio NIST612 mediante ns-LA a 193 nm en atmósfera de Ar (izquierda) y en atmósfera de He (derecha)<sup>66</sup>.

Se han descrito varios mecanismos para explicar las ventajas que aporta la utilización de He<sup>5</sup> que se basan en las propiedades particulares (potencial de ionización, masa atómica, conductividad térmica, densidad) de este gas.

Según Von Allmen<sup>69</sup>, los responsables de las cualidades del He como gas portador para ablación láser son su alto potencial de ionización (1.5 veces más elevado que el del Ar) y su baja masa atómica. El He es fácilmente ionizable, por lo que facilita la formación del microplasma generado en la superficie del material ablacionado. Por otro lado, un gas de mayor masa atómica, como el Ar, favorece las colisiones entre las especies del gas y entre las especies del gas y la nube de ablación, por lo que aumenta la formación de partículas aglomeradas y aumentan así las pérdidas debidas a los impactos y la inercia.

La elevada conductividad térmica del He (casi 10 veces superior a la del Ar) también ayuda a “enfriar” el microplasma generado en la superficie de la muestra, ya que la energía térmica se extrae más rápidamente. Horn y Günther<sup>68</sup> mostraron que este microplasma es más bajo en una atmósfera de He que en una de Ar ya que el mencionado enfriamiento del microplasma limita la fase de crecimiento de las partículas por condensación (Figura 4.3), observándose un aumento de un 570% en el número de partículas finas (100- 200 nm) y una disminución del 46% de las más gruesas (2.5  $\mu\text{m}$ ).

De este modo, las partículas formadas son más pequeñas, las pérdidas por inercia limitadas y su transporte al ICP mejora.

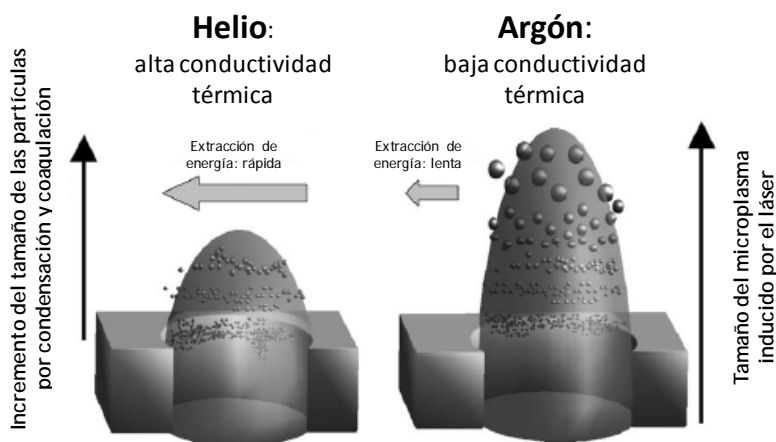


Figura 4.3. Diferencias observadas en la distribución por tamaños de las partículas para ablaciones con un sistema de 193 nm utilizando He y Ar como gases portadores<sup>68</sup>.

Eggs y cols.<sup>65</sup> apuntan a la densidad del He (un orden de magnitud por debajo de la del Ar) como responsable de la mejora en la eficiencia en el transporte del material ablacionado al ICP. Durante la propagación del microplasma generado por el láser, se desarrolla una región característica de alta presión en la punta de la pluma del mismo donde su expansión es impedida por la presencia del gas ambiental. Este efecto es más significativo a presión atmosférica y en gases de mayor densidad como el Ar, en los que el microplasma se ve restringido a un pequeño volumen. Puesto que la pluma del microplasma dispone de una pequeña cantidad de energía para dirigir su expansión, las fuerzas que mantienen esta región de alta presión finalmente se disipan, la expansión de la pluma se estanca y la región de alta presión se relaja, dirigiendo una porción del material de la pluma hacia atrás para ser depositado en la superficie de la muestra. Las partículas grandes que se han podido formar por condensación en la parte fría del microplasma serán menos eficientemente redirigidas a la superficie de la muestra, debido a su mayor momento intrínseco. Por el contrario, los elementos volátiles mayoritariamente presentes en las partículas pequeñas, serán más fácilmente dirigidos hacia la superficie del material y, por tanto, el depósito en la superficie estará

preferentemente enriquecido en elementos volátiles. Las partículas refractarias sufrirán igualmente fraccionamiento y se condensarán en las paredes internas del cráter.

Estos efectos beneficiosos del He no son tan notables en el caso de un aerosol producido por LA de nanosegundos a 266 nm en un material transparente. Debido a la penetración del haz del láser en el seno del material se forman partículas primarias grandes en mayor medida, por lo que la fase de condensación, que afecta principalmente a las partículas pequeñas y que es en la que el He aporta los beneficios respecto al Ar, es mucho más reducida<sup>68</sup>. En consecuencia, el cambio en la distribución por tamaños de las partículas utilizando He en lugar de Ar es menos pronunciado.

#### 4.1.1.6. Cifras de mérito de la técnica LA-ICP-MS

A pesar de las mencionadas limitaciones, el número de aplicaciones en las que la LA-ICP-MS se utiliza con éxito crece continuamente. Las cifras de mérito dependen fuertemente de la aplicación, la instrumentación y las condiciones de operación del sistema de LA y del ICP-MS conectado a él<sup>9</sup>. En cualquier caso, uno de los principales atributos de la LA-ICP-MS es la sensibilidad, pudiendo competir los límites de detección de la técnica con los de los análisis en disolución, ya que éstos generalmente requieren diluciones para asegurar unas condiciones de operación estables en el ICP-MS. Dependiendo de la resolución espacial deseada, que determina la máxima cantidad de muestra que puede ser analizada, mediante LA-ICP-MS se pueden lograr LODs por debajo de los ng g<sup>-1</sup> para diámetros de haz por encima de los 100 μm<sup>49</sup>, mejorando la sensibilidad con el aumento de la resolución espacial, de acuerdo con la menor cantidad de muestra tomada y para una eficiencia de detección dada.

Las interferencias espectrales derivadas de las disoluciones no se dan habitualmente en LA-ICP-MS (excepto si se trabaja en condiciones de plasma húmedo) y ello mejora significativamente la exactitud que puede conseguirse; mientras que los tiempos de integración menores, requeridos dada la naturaleza transitoria de las señales obtenidas por LA, limitan la precisión.

#### 4.1.1.7. Aplicaciones

Dadas las ventajas que presenta la ablación láser acoplada a ICP-MS para el análisis directo de muestras sólidas, la bibliografía recoge numerosas aplicaciones. A continuación se presentan las áreas de aplicación más importantes.

Sin duda es en el área de la **geología** donde la LA-ICP-MS ha cosechado más éxito, constituyendo una técnica analítica establecida gracias a su resolución espacial y alta sensibilidad que le permiten determinar elementos traza en la escala de los  $\mu\text{m}$ . Así, se ha empleado ampliamente para el análisis de trazas y ultra-trazas en minerales<sup>19</sup>, en estudios de geocronología<sup>32, 70, 71</sup>, en estudios de formación de menas mediante el análisis de inclusiones fluidas<sup>72, 73</sup> o, para el análisis de relaciones isotópicas precisas en minerales con ICP-MS multicolector<sup>74, 75</sup>, entre otros.

Otro importante campo de aplicación de la LA-ICP-MS es el **forense**, siendo una de las áreas que más rápidamente ha crecido en los últimos años la identificación de piedras preciosas, gracias a las propiedades cuasi no-destructivas de la LA<sup>76, 77</sup>. En criminalística, el estudio de “huellas” de materiales (*fingerprinting*) está adquiriendo cada vez más importancia (de vidrios<sup>78</sup>, diamantes<sup>79</sup>, cintas adhesivas<sup>80</sup>, etc.). La LA-ICP-MS se utiliza en estas investigaciones para caracterizar, por medio de la composición elemental relativa de elementos traza, y comparar materiales hallados en la escena del crimen o relacionados con un delito o un sujeto sospechoso. También se han realizado investigaciones sobre cosechas de cannabis<sup>81</sup> u análisis de oro<sup>82, 83</sup>.

En las **ciencias de los materiales**, la LA-ICP-MS se ha utilizado para la determinación de niveles bajos y trazas de elementos en materiales refractarios (como  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{CeO}_2$ , u otras materias primas) y en materiales ópticos de alta gama y cerámicas<sup>7, 84, 85</sup>. Además la LA-ICP-MS está cobrando relevancia para el estudio de la distribución local de elementos en diferentes tipos de muestras<sup>86</sup>.

Un área de aplicación relativamente reciente es el **sector biomédico**. Tras el pionero trabajo de Nielsen y cols.<sup>87</sup>, los estudios sobre la distribución de elementos en

electroferogramas en 2D, las propiedades de unión de las proteínas a metales o las concentraciones de P y S en las mismas son más frecuentemente llevados a cabo mediante LA-ICP-MS<sup>88-90</sup>. Además, cabe resaltar la aplicación de la LA-ICP-MS como técnica de mapeo para determinar las distribuciones cuantitativas de metales, no-metales y compuestos orgánicos en muestras biológicas<sup>91, 92</sup>. En este sentido, destacan los trabajos de Becker y cols.<sup>93-96</sup> que han investigado el mapeo en dos dimensiones de elementos traza (Cu, Zn, Pb, P y S) en secciones finas de tejido humano y de cerebro de rata por LA acoplada a ICP-MS de sector magnético (ICP-SFMS), para generar indicadores que puedan monitorizar determinados riesgos para la salud.

En **arqueología** la LA-ICP-MS permite llevar a cabo estudios de autenticidad de antigüedades gracias a su naturaleza cuasi no-destructiva. Así, se han llevado a cabo análisis de objetos antiguos de plata<sup>97</sup> y oro<sup>98</sup>, monedas antiguas<sup>99</sup>, hierro de principios de la Edad Media<sup>100</sup> o fuentes de obsidiana<sup>101</sup>.

Por último, entre las áreas de aplicación que más destacan estarían aquellas relacionadas con el **medio ambiente**. La LA-ICP-MS ha permitido realizar análisis directos de infinidad de tipos de muestras: anillos de árboles (para monitorizar cambios en las condiciones atmosféricas, en la química del suelo y cambios en la polución)<sup>102</sup>, corteza de árboles (para estudios de contaminación)<sup>103, 104</sup>, hojas vegetales (para estudios sobre contaminación y toma de nutrientes)<sup>92, 105, 106</sup>, materia particulada del aire<sup>107-109</sup>, o diversos tejidos biomineralizados como otolitos de peces<sup>110, 111</sup>, escamas<sup>112-116</sup>, corales<sup>117-119</sup> y conchas de moluscos<sup>52, 120, 121</sup> (que pueden reflejar cambios ambientales y contaminación), por citar algunas de la aplicaciones más relevantes.

## 4.1.2. Aplicación de LA-ICP-MS al análisis de elementos traza en tejidos biomineralizados

Como se ha mencionado, una de las aplicaciones destacadas dentro del área del medio ambiente en la que la LA-ICP-MS se ha convertido en una de las técnicas de elección es el análisis de elementos traza en tejidos calcificados o estudio de la microquímica de tejidos biomineralizados. Ello es debido a su excelente sensibilidad y capacidad de determinación directa de metales en sólidos aportando información sobre su distribución espacial.

### 4.1.2.1. Análisis de elementos traza en tejidos calcificados

La microquímica de los tejidos biomineralizados o calcificados, principalmente de otolitos y en menor medida de escamas, corales y conchas, ha sido ampliamente estudiada para la determinación de la historia medioambiental de numerosos organismos acuáticos. La fase mineral de estos tejidos incorpora los elementos pesados a los que el organismo se expone durante su desarrollo<sup>116</sup> y puede presentar anillos o láminas de crecimiento, lo que ofrece la posibilidad de examinar la incorporación de metales a lo largo del tiempo. De este modo, analizando en estas estructuras la composición microelemental en una escala espacial, se obtiene un registro histórico de exposición reciente y pasada a metales.

Entre los tejidos estudiados, los otolitos de peces son sin duda los más ampliamente investigados para estudiar la exposición a contaminación ambiental<sup>111, 122-126</sup>. Los otolitos son estructuras de carbonato cálcico (principalmente aragonito) metabólicamente inertes situados en el interior del oído interno de los peces teleósteos, que mantienen el equilibrio del pez y actúan como sensor de profundidad. Los primeros estudios sobre otolitos en peces datan de principios de este siglo. Reibisch<sup>127</sup> fue, en 1899, el primero que observó al microscopio la presencia de anillos anuales en los otolitos, constituidos por bandas translúcidas -zonas de crecimiento lento en invierno-, alternadas con bandas opacas -zonas de crecimiento rápido en verano- (Figura 4.4). Desde entonces y hasta principios de los años 70 los otolitos se utilizaron fundamentalmente para la

determinación de la edad y el crecimiento en peces adultos, mediante el recuento de los anillos anuales o estacionales. Acompañando al Ca, existen en los otolitos elementos metálicos (Sr, Ba, Mg, Cd, Co, Cu, Zn, Na, K, etc...) y otros no metálicos (Si, P, S, B, etc...) a nivel de trazas. Si bien todos los factores que afectan a la composición elemental de los otolitos no se conocen completamente, la incorporación de éstos en el otolito parece estar estrechamente relacionada con los cambios fisiológicos en las distintas fases de desarrollo y con el medio ambiente que rodea al pez (cambios de temperatura, fuentes de alimentación, niveles de nutrientes y contaminantes disueltos en agua de mar, etc.)<sup>128</sup>; así, por ejemplo, la relación Sr/Ca parece estar inversamente relacionada con la temperatura<sup>129, 130</sup>. En base a esta hipótesis, las poblaciones que se encuentran en hábitats distintos pueden caracterizarse por la diferente composición elemental de los otolitos. Este criterio ha sido ampliamente utilizado para la discriminación entre distintos stocks<sup>123, 131</sup>, la evaluación de patrones migratorios<sup>132, 133</sup> y para trazar la historia medioambiental de peces<sup>129</sup> o cefalópodos<sup>126, 134</sup>.

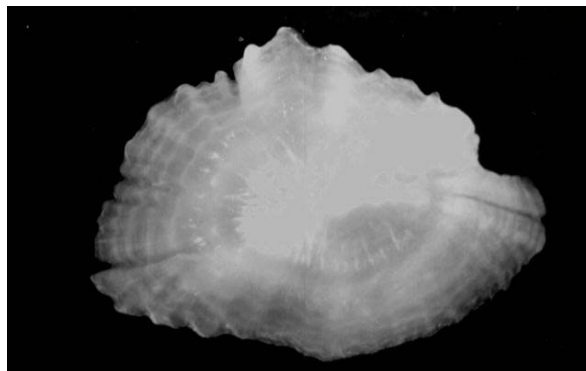


Figura 4.4. Imagen de un otolito en el que se aprecian los anillos de crecimiento<sup>135</sup>.

Las escamas de los peces, que también presentan anillos de crecimiento y se utilizan habitualmente para calcular la edad de los individuos, han sido asimismo analizadas para estimar la variación en la carga corporal de metales a lo largo del tiempo<sup>112-116</sup>.

Los corales son otro grupo de organismos en los que se han realizado análisis elementales con resolución espacial<sup>117, 118</sup>. En este caso, las relaciones elementales (Sr/Ca, Ba/Ca) en el esqueleto de aragonito de los mismos aportan importante

información geoquímica para el establecimiento de una cronología de eventos para un registro (paleo)ambiental<sup>119</sup>.

Cabe destacar por último los estudios en bivalvos, que incorporan en sus conchas los elementos del medio circundante en el proceso de calcificación de las mismas. La existencia en las conchas de láminas de crecimiento las convierte, de modo análogo a los casos anteriores, en archivos potenciales de las condiciones ambientales durante diferentes periodos de tiempo<sup>52, 120, 121, 136</sup>.

#### 4.1.2.2. Métodos analíticos por LA-ICP-MS para el estudio de elementos traza en tejidos calcificados

En la Tabla 4.3 se recoge un resumen de las aplicaciones más destacadas de LA-ICP-MS para el análisis de elementos traza en tejidos calcificados. Como se observa, la mayoría de los mismos se ha realizado con láseres de estado sólido de Nd:YAG que operan a 213 y 266 nm. En cuanto a las estrategias de calibración, lo más habitual es llevar a cabo la cuantificación por comparación con un único patrón, frecuentemente con un vidrio de la serie 61X del NIST o con un SRM con el que la matriz se asemeja más al tipo de muestra (como el SRM 1486). En algunos trabajos no se cuantifican las concentraciones de los analitos, sino que se tratan las relaciones de los mismos respecto al Ca<sup>113, 119, 132</sup>. Sinclair y cols.<sup>118</sup> sintetizaron un vidrio de wollastonita (CaSiO<sub>3</sub>) a partir de coral triturado y sílica, en el que determinaron la concentración de analitos por ICP- IDMS antes de su utilización como patrón para LA-ICP-MS. Sin embargo, se describen también procesos de síntesis de patrones de calibración *matrix-matched*, para realizar rectas de calibración de varios puntos. Los procedimientos de co-precipitación de carbonato cálcico (CaCO<sub>3</sub>) con los analitos llevados a cabo por Bellotto y Miekeley<sup>136</sup> y Barats y cols.<sup>52</sup> (utilizado asimismo por Tabouret y cols.<sup>110</sup>) son buenos ejemplos de ello. Thorrold y cols.<sup>122</sup> prepararon cuatro patrones mezclando otolito triturado y L<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> en relación 1:1, añadiendo después los analitos. Independientemente de la estrategia de calibración utilizada, el Ca es el patrón interno por excelencia.



En lo que a la duración de pulsos de los láseres empleados se refiere, los láseres de nanosegundos dominan las aplicaciones, aunque alguna aplicación reciente se basa ya en la utilización de láseres que operan en la escala de los femtosegundos<sup>110</sup>.

Tabla 4.3. Resumen de aplicaciones de LA-ICP-MS para el estudio de la microquímica de tejidos calcificados.

Estructura	Organismo	Instrumentación	Analitos	Calibración	Referencia
Otolitos	Corvina blanca ( <i>Micropogonias undulatus</i> )	355 nm nsLA ICP-QMS	Mg, Zn, Sr, Ba, Ca (IS)	4 patrones (otolito molido + Li <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> + analitos)	Thorrold, 1997 <sup>122</sup>
Corales	<i>Porites mayeri</i> (de la GBR)	193 nm nsLA ICP-QMS	B, Mg, Sr, Ba, U, Ca (IS)	Vidrio de CaSiO <sub>3</sub> (sintetizado)	Sinclair, 1998 <sup>118</sup>
Conchas	Mejillón ( <i>Perna perna</i> )	266 nm nsLA ICP-QMS	Cr, Mn, Co, Cu, Zn, As, Sr, Cd, Sn, Ba, Hb, Pb, Ca (IS)	Patrones sólidos de CaCO <sub>3</sub> (sintetizados)	Bellotto, 2000 <sup>136</sup>
Escamas	Tímalo ( <i>Thymallus arcticus</i> )	Nd:YAG LA ICP-QMS	Mg, Ni, Zn, As, Se, Cd, Sb, Hg, Pb, Ca (IS)	(No especificado)	Farrel, 2000 <sup>113</sup>
Otolitos	Lubina estriada ( <i>Morone saxatilis</i> )	355 o 532 nm nsLA ICP-MS	Li, Be, B, Mg, Al, S, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Cd, Sn, Sb, I, Ba, Ce, Hg, Pb, Ca (IS)	(No cuantifican, comparan intensidades de señal)	Gemperline, 2002 <sup>132</sup>
Otolitos	Pez anádromo	266 nm nsLA MC-ICP-MS	<sup>87</sup> Sr/ <sup>86</sup> Sr	-	Outridge, 2002 <sup>137</sup>
Otolitos, escamas	Trucha de Yellowstone ( <i>Oncorhynchus clarki lewisi</i> )	266 nm nsLA HR-ICP-MS	Mg, Mn, Sr, Ba, Ca (IS)	(No cuantifican, cálculo de ratios molares)	Wells, 2003 <sup>114</sup>
Corales	<i>Porites</i> (de la GBR)	193 nm nsLA ICP-QMS	Relaciones Ba/Ca	-	McCulloch, 2003 <sup>119</sup>
Otolitos	Dorada ( <i>Pagrus auratus</i> )	266 nm nsLA HR-ICP-MS	Mn, Sr, Ba, Ca (IS)	NIST 612	Hamer, 2003 <sup>133</sup>

Tabla 4.3. (Cont.) Resumen de aplicaciones de LA-ICP-MS para el estudio de la microquímica de tejidos calcificados.

Estructura	Organismo	Instrumentación	Analitos	Calibración	Referencia
Otolitos	Arenque del Atlántico ( <i>Clupea harengus</i> ) y espadín ( <i>Sprattus sprattus</i> )	213 nm nsLA ICP-QMS	Mn, Ca (IS)	NIST 612	Brophy, 2004 <sup>138</sup>
Conchas	Mejillones ( <i>Mytilus californianus</i> y <i>Mytilus galloprovincialis</i> )	213 nm nsLA HR-ICP-MS	Mg, Cr, Mn, Zn, Sr, Ba, Pb, U, Ca (IS)	NIST 612, 614, 616	Becker, 2005 <sup>121</sup>
Estatolitos	Calamar ( <i>Gonatus fabricii</i> )	266 nm nsLA HR-ICP-MS	Sr, Ba, Mg, U, Zn, Mn, Y, Zr, Na, Ca (IS)	NIST 610 y 612	Zumholz, 2007 <sup>134</sup>
Concha	Vieira ( <i>Pecten maximus</i> )	266 nm nsLA ICP-QMS	V, Cr, Mn, Co, Cu, As, Se, Sr, Mo, Cd, Sn, Sb, Ba, Hg, Pb, Ca (IS)	Patrones sólidos de CaCO <sub>3</sub> (sintetizados)	Barats, 2007 <sup>52</sup>
Otolitos	Brema negra ( <i>Acanthopagrus butcheri</i> )	266 nm nsLA ICP-QMS	Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Sr, Cd, Sn, Ba, Hg, Pb, As, Se, Ca (IS)	NIST 610	Ranaldi, 2008 <sup>126</sup>
Escamas de sedimentos	-	213 nm nsLA ICP-QMS	Mg, Mn, Fe, Cu, Zn, As, V, Cr, Co, Ni, Cd, Pb, Ca (IS)	SRM 1486 NIST 612	Hola, 2009 <sup>116</sup>
Otolitos	Anguila común ( <i>Anguilla anguilla</i> )	1030 nm fsLA ICP-QMS	Ba, Sr, Ca (IS)	Patrones sólidos de CaCO <sub>3</sub> (sintetizados)	Tabouret, 2010 <sup>110</sup>

#### 4.1.3. Análisis de elementos traza en espina dorsal de túnidos como potencial indicador de contaminación

Los túnidos son un grupo de peces teleósteos que se encuentran en la cima de la cadena alimentaria. Son considerados peces de alto rendimiento, con elevado metabolismo y ritmo de alimentación, lo que contribuye a una notable acumulación de metales en sus

tejidos<sup>139</sup>. Representan un importante recurso marítimo entre los peces predadores para la industria pesquera, la economía y la sociedad, constituyendo una importante fuente de alimento tanto en países desarrollados como en países en vías de desarrollo<sup>140</sup>. En España las variedades más valoradas y consumidas son el bonito (*Thunnus alalunga*, Bonnaterre, 1788) y el atún rojo (*Thunnus thynnus*, Linnaeus, 1758). El bonito es un producto estacional que sólo se captura durante los meses de verano (de Junio a Septiembre) por las flotas costeras del Mar Cantábrico (Golfo de Bizkaia) y raramente supera los 12 kg de peso en su edad adulta. El atún rojo es capturado en el Atlántico Norte o en Newfoundland (Canadá) y puede pesar más de 50 kg.

Ambas especies, el bonito y el atún rojo, tienen varias estructuras calcificadas en las que presentan anillos de crecimiento que se han utilizado para estimar la edad de los individuos. Estos anillos aparecen con una periodicidad estacional, creciendo normalmente de forma lenta en invierno para formar una banda estrecha translúcida, y más rápido en verano, dando lugar a bandas más anchas y opacas dado que la estación es más favorable para el crecimiento. La formación y biomineralización de estos anillos de crecimiento depende, como se ha mencionado en el caso de los otolitos, de factores metabólicos y ambientales, como el clima, las migraciones, la nutrición, etc<sup>141</sup>. Las estructuras calcificadas tradicionalmente utilizadas en estudios de crecimiento en túnidos son las espinas de la aleta dorsal, los otolitos, las vértebras y las escamas<sup>142</sup>. Entre ellas, la primera espina de la primera aleta dorsal ha sido habitualmente elegida para estudios de crecimiento porque es fácil de extraer (ya que no se requiere diseccionar el pez) y presenta anillos de crecimiento relativamente bien definidos<sup>143, 144</sup>. Igualmente, en comparación con otras estructuras calcificadas, la extracción de la espina dorsal no interfiere con el valor de mercado del pez y, teniendo en cuenta que las estimaciones de edad y tasas de crecimiento se llevan a cabo en secciones finas hechas en la base de la misma, no se requiere una preparación de muestra laboriosa. Según Gillanders<sup>131</sup>, además, esta espina puede ser extraída de peces vivos para su posterior liberación, lo que resulta interesante cuando sacrificar al pez para evaluar el estado de la población resulta inapropiado. En la Figura 4.5 se muestra la primera espina de la primera aleta dorsal en un bonito y en un atún rojo.

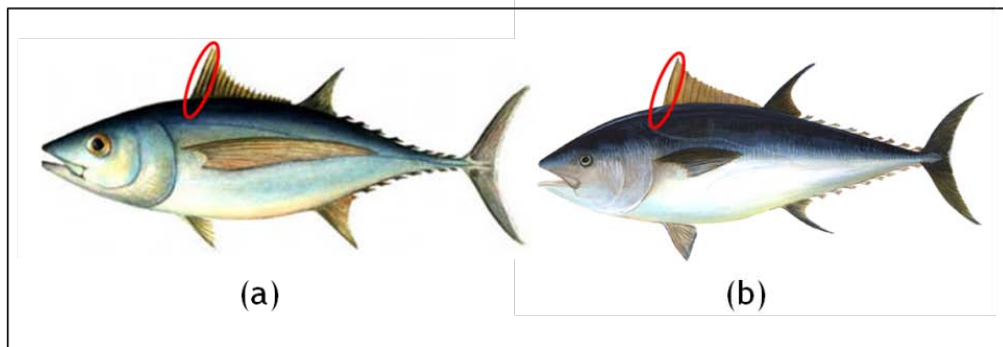


Figura 4.5. Primera espina de la primera aleta dorsal en: (a) Bonito (*Thunnus alalunga*); (b) Atún rojo (*Thunnus thynnus*).

En los casos en los que la edad de los atunes se determina utilizando secciones transversales de la primera espina dorsal, la interpretación de los anillos de crecimiento se basa en el reconocimiento de zonas estrechas translúcidas y zonas opacas más anchas que se asume representan periodos de crecimiento lento y rápido, respectivamente. Ocasionalmente pueden también observarse zonas translúcidas dobles que se interpretan como un único evento periódico de crecimiento lento<sup>145</sup>. Una zona translúcida, bien sea simple o doble, junto con la correspondiente zona opaca se asume que representa una banda de crecimiento anual<sup>146, 147</sup>. Sin embargo, dado que el núcleo de la espina es reabsorbido, los primeros anillos empiezan a desaparecer a la edad de tres años, por lo que se hace necesario utilizar el diámetro medio de los primeros anillos de los individuos más jóvenes para inferir la edad de los primeros anillos visibles de los individuos más viejos. En la Figura 4.6 se observa un ejemplo de un corte transversal de la primera espina dorsal de un atún rojo (*Thunnus thynnus*).

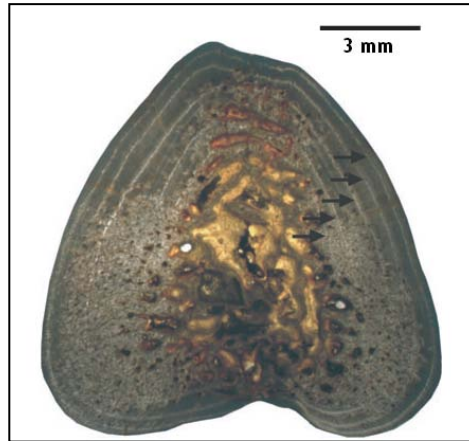


Figura 4.6. Anillos de crecimiento en una sección transversal de la primera espina dorsal de un atún rojo (*Thunnus thynnus*) de 7 años de edad, con 5 anillos visibles y 2 reabsorbidos. Las flechas indican los anillos visibles. (Imagen de Santamaría<sup>145</sup>)

A pesar del uso extendido de la primera espina de la primera aleta dorsal de atún rojo y bonito en estudios de crecimiento, un único trabajo hace referencia al posible uso de esta estructura calcificada como indicador de exposición a contaminación ambiental<sup>148</sup>. Teniendo en cuenta las similitudes entre la primera espina de la aleta dorsal y las mencionadas estructuras (otolitos, escamas, etc.), cabría esperar que la fracción mineral de la espina incorpore los elementos traza a los que el atún se expone durante su crecimiento. Aunque, a diferencia de los otolitos, las espinas de la aleta dorsal no conserven todos los anillos de crecimiento en el caso de los individuos mayores, conservan siempre los anillos de los últimos años de vida, por lo que podrían servir como indicadores de lo acontecido en los últimos años del individuo. Algunos trabajos previos han comparado la microquímica de los otolitos con las lentes oculares<sup>131, 149</sup>, las escamas<sup>131, 150</sup> y las espinas de la aleta dorsal<sup>131</sup>, utilizando ICP-MS en disolución y han demostrado correlaciones razonablemente buenas en la composición elemental de estas estructuras.

Un trabajo recientemente publicado por Davies y cols.<sup>148</sup> ha evaluado la composición elemental de las espinas dorsales de bonito, para compararlas con la de los otolitos de los mismos individuos e intentar determinar así si las concentraciones elementales de ambas están correlacionadas. En este estudio se examinaron los otolitos y las espinas dorsales de 16 bonitos mediante LA-ICP-MS, ablacionando 2 únicos puntos (el último

anillo opaco y el último translúcido) en cada muestra. De entre los 4 elementos analizados (Mg, Mn, Sr y Ba), el Ba presentó una débil aunque significativa correlación en el anillo opaco de ambas estructuras. El resto de correlaciones elementales en ambos anillos, aunque resultaron más altas en los anillos de crecimiento opacos, no fueron significativas, lo que podría deberse a que los puntos ablacionados no correspondían exactamente a los mismos momentos en la vida del pez. En este trabajo la cuantificación de los analitos se realizó utilizando el vidrio NIST 612 como patrón de calibración. Sin embargo, dados los mencionados efectos de fraccionamiento elemental que sufre la técnica, la obtención de resultados cuantitativos de calidad (exactos y precisos) puede depender, en gran medida, de la estrategia de calibración seleccionada. Por lo tanto, cabría pensar que una estrategia de calibración en matriz podría resultar más adecuada.

La fase mineral de las espinas de peces se compone de hidroxiapatito (HAp), cuya fórmula simplificada es  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Existen actualmente dos materiales de referencia certificados de matriz similar: "NIST SRM 1486 Bone Meal" de harina de hueso y "NIST 1400 Bone Ash" de ceniza de hueso. Sin embargo, estos dos materiales de referencia se encuentran certificados para pocos elementos: Ca, Mg, P, Fe, Pb, K, Sr y Zn, lo que supone una limitación para estudios de este tipo, en los que habitualmente se suelen estudiar más elementos.

Aparte de en la mencionada publicación de Davies y cols.<sup>148</sup>, y siempre según nuestro conocimiento, hasta la fecha no hay trabajos publicados en los que se analicen espinas por LA-ICP-MS.

Sin embargo, se han publicado varios trabajos en los que se han analizado muestras de matriz similar a la de las espinas, como son el hueso y la dentina, por LA-ICP-MS. En ellos se han empleado diferentes estrategias de calibración:

- Ghazi y cols.<sup>151</sup> analizaron Ga a lo largo de la dentina radicular humana utilizando el vidrio NIST 612 como patrón de cuantificación, es decir, sin utilizar una matriz de composición y morfología similar a la de la muestra para calibrar (*non matrix-matching calibration*).

- Uryu y cols.<sup>152</sup> determinaron Pb en esmalte dental utilizando cada uno de los materiales de referencia de hueso anteriormente mencionados (SRM 1486 y SRM 1400) como calibrantes, realizando calibraciones *matrix-matching* con un único punto.
- Bellis y cols.<sup>153</sup> analizaron por su parte Pb en hueso utilizando cuatro materiales candidatos a material de referencia de la Agencia de Salud del Estado de Nueva York de Pb en hueso bovino o caprino (*matrix-matching calibration*)
- Stadlbauer y cols.<sup>154</sup> analizaron hueso y dientes de individuos de los siglos XVIII y XIX preparando patrones *matrix-matched* en el laboratorio. Para ello, partieron de un HAp puro, comercial, que disolvieron en ácido nítrico, donde añadieron los analitos en disolución para evaporar después la mezcla hasta sequedad.
- Gruhl y cols.<sup>155</sup>, por último, determinaron gradientes de concentración en tejido óseo generado de un implante ortopédico degradable, para lo cual prepararon una serie de patrones *matrix-matched* de HAp. Para ello, en primer lugar precipitaron HAp, que doparon después con elementos de tierras raras.

En este último trabajo se recoge que mediante el método de síntesis de patrones de HAp propuesto los elementos dopados se sitúan presumiblemente en la superficie de las partículas del polvo precipitado, algo que se evitaría mediante la co-precipitación de HAp con los elementos de interés en una misma etapa. Sin embargo, no hay referencias que recojan la co-precipitación de HAp con los analitos para preparar patrones sólidos de calibración para el análisis por LA-ICP-MS.

## 4.2. Planteamiento del problema

En el presente estudio se plantea desarrollar una serie de patrones sólidos de HAp para llevar a cabo una calibración *matrix-matched* que permita realizar análisis cuantitativos de elementos traza por LA-ICP-MS en dicha matriz. Se plantea para ello una novedosa síntesis de HAp: la co-precipitación de éste con los analitos a estudiar. Asimismo, se evaluará la validez de estos patrones para las mencionadas cuantificaciones por LA-ICP-MS, estudiando su homogeneidad y los parámetros analíticos obtenidos mediante LA-ICP-MS (sensibilidad, límites de detección, precisión y exactitud). Además, se comparará esta estrategia de calibración con la calibración mediante un vidrio de la serie 61X del NIST (*non-matrix matching calibration*). Por último, el método desarrollado se utilizará para analizar muestras reales y evaluar la adecuación de la primera espina de la primera aleta dorsal del atún rojo (*Thunnus thynnus*) y del bonito (*Thunnus alalunga*) como indicador de contaminación.

Previamente se cuantificará el contenido de metales en las primeras espinas de la aleta dorsal y en el tejido muscular de atún rojo y bonito mediante un método basado en ICP-MS en disolución y se estudiarán las correlaciones entre las concentraciones en ambas estructuras.



## 4.3. Material y equipamiento

### 4.3.1. Equipamiento

El sistema de ablación láser utilizado fue el modelo UP266 de New Wave Research Co. Ltd (Huntingdon, UK), que opera a una longitud de onda de 266 nm, en modo Q-Switch, con una duración de pulso de 4 ns y energía máxima de 4 mJ. El aerosol generado por el láser en la celda de ablación es transportado mediante una corriente de He por un tubo de poliuretano de un metro de longitud (diámetro interno de 4 mm) y mezclado por medio de un conector en Y con un aerosol líquido, el cual es nebulizado por medio de un nebulizador MicroMist, antes de alcanzar el plasma.

Los detalles generales del ICP-MS utilizado (Agilent 7500ce) se han dado en el Capítulo 3. Para este estudio se utilizó la antorcha convencional con inyector de 2.5 mm de diámetro. Para los análisis en disolución se utilizó el sistema de octopolo de reacción (ORS, *Octopole Reaction System*) del que dispone el ICP-MS en modo de colisión con He, el cual permite eliminar las interferencias poliatómicas. El tratamiento de datos de los análisis en disolución convencionales se llevaron a cabo con el software del equipo (ChemStation System G1834B, revisión B.03.02) y los correspondientes a los análisis por ablación láser y dilución isotópica se elaboraron en hojas de cálculo de Microsoft Office Excel 2007.

En la primera etapa del trabajo con LA-ICP-MS, realizada en el Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement de la Université de Pau et des Pays de l'Adour en el seno del Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur l'Environnement et les Matériaux -IPREM (CNRS UMR 5254), se utilizó un sistema de ablación láser UP213

de New Wave Research, que opera a una longitud de onda de 213 nm. En este periodo se utilizó un ICP-MS modelo Elan DRC-II de Perkin Elmer (Shelton, CT, USA).

Para realizar los cortes transversales de las espinas dorsales para su análisis por LA-ICP-MS se utilizó una sierra de diamante de rotación lenta Isomet (Buehler, Dusseldorf, Alemania). Las secciones de las espinas se colocaron sobre portaobjetos con cinta adhesiva de doble cara.

Para moler las espinas se empleó un mortero de ágata y un molino de bolas Dismembrator II (Braun Biotech International, Melsungen, Alemania) equipado con un depósito de Teflon™ y bolas del mismo material de 10 mm de diámetro.

Para la digestión ácida de las muestras se empleó un horno microondas Berghof modelo Speedwave® Four (Eningen, Alemania) equipado con vasos de Teflon™ modelo DAP-60. Para facilitar las pesadas y evitar pérdidas, las muestras fueron pesadas directamente en microcápsulas de Teflon™, que eran posteriormente introducidas en los vasos de digestión.

En la preparación de los patrones sólidos de HAp se utilizó una placa de agitación magnética de IKA (Staufen, Alemania) y un agitador orbital modelo KS-15 de Edmund Bühler GmbH (Hechingen, Alemania). Para la filtración se utilizaron embudos y botes de polipropileno y papel de filtro plisado de grado 2V de Whatman (Maidstone, UK). Para someter el HAp a tratamiento térmico se empleó un generador de corriente (Hemitechnic, Paris, Francia) y botes de cuarzo fabricados para tal propósito. Para hacer los *pellets* se utilizó una prensa hidráulica de Eurolabo (Paris, Francia) con un molde de 13 mm de diámetro de Pike Technologies (Watertown, WI, USA). Todo el proceso de síntesis del HAp se llevó a cabo en una sala blanca ISO clase 7, en el Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement en Pau.

Los estudios de difracción por rayos X del HAp sintetizado se realizaron con un difractómetro INEL XRG 3000 (Artenay, Francia) en las instalaciones de la Université de Pau et des Pays de l'Adour.

Tanto las muestras como los reactivos y patrones fueron pesados en una balanza analítica Ohaus Pioneer Precision modelo PA114C (Pine Brook, NJ, USA). Patrones y muestras fueron almacenados en botes de polipropileno de Azlon (Staffordshire, UK). Los portaobjetos con las muestras de espinas se guardaron en botes de 50 mL de polipropileno (SCP Science, Courtaboeuf Cedex, Francia).

### 4.3.2. Reactivos y disolventes

#### 4.3.2.1. Patrones

Para el ajuste diario de las condiciones del ICP-MS se utilizó una disolución de 1  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Li, Mg, Co, Y, Ce y Tl en ácido nítrico al 2% suministrada por Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA).

Los patrones monoelementales de los analitos (B, Mg, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Pd, Cd, Ba, La, Hg, Pb) y los patrones internos para los análisis en disolución (Y, Ce, Ir) de 1000  $\text{mg L}^{-1}$  fueron suministrados por SCP Science. El patrón de Er para calcular el tiempo muerto del detector fue suministrado por Inorganic Ventures (Lakewood, NJ, USA). Para el dopaje de los patrones sólidos de HAp se utilizó además un patrón sólido de Mg ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$ , 99.999% Puratrem) de Strem Chemicals (Estrasburgo, Francia).

Los patrones de Cd, Cr, Pb y Se enriquecidos en  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{53}\text{Cr}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  y  $^{77}\text{Se}$  respectivamente se obtuvieron de ISC-Science (Oviedo, España) como disoluciones acidificadas de 10.14, 9.93, 9.20 y 9.81  $\mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente. El Ba enriquecido en  $^{135}\text{Ba}$  fue suministrado por Inorganic Ventures, como solución acidificada de 10  $\text{mg L}^{-1}$ .

Todas las disoluciones de los patrones se prepararon en ácido nítrico *sub-boiling* al 1% por pesada y se conservaron en refrigeración a 4 °C.

#### 4.3.2.2. Destilación del ácido nítrico *sub-boiling*

Con el fin de no introducir impurezas metálicas adicionales en los tratamientos de muestra y conseguir los blancos adecuados para el trabajo en ultratrazas, se utilizó un sistema de destilación lenta de ácido nítrico (*sub-boiling*). El calentamiento del ácido se lleva a cabo mediante una lámpara IR de modo que la evaporación es lenta y prácticamente sin que se formen burbujas, lo que reduce las posibilidades de arrastre de impurezas en el ácido destilado<sup>156, 157</sup>.

En la Figura 4.7 se puede observar una fotografía del sistema utilizado en este trabajo. Para ello, dos botes de Teflon™ de la mayor pureza (PFA) se unieron mediante un codo con un ángulo de 90° del mismo material (Savillex, Minnetonka, MN, USA). Tanto el codo como los vasos se sometieron a un exhaustivo lavado con ácido caliente de calidad Suprapur de Merck (65%) durante 12 horas. A continuación, se conectaron entre sí, colocándose 50 mL de ácido de pureza media (ácido nítrico para análisis de Merck) en una de ellas. Ese ácido se irradió con una lámpara de infrarrojo (150 W, Philips) colocada a una distancia tal de la botella que el ácido no se calentara en exceso. De esta manera se consigue una destilación del ácido lo suficientemente lenta para que la mayoría de las impurezas metálicas no pasen a fase vapor, por lo que el ácido, que se condensa en el otro bote (más frío puesto que no está irradiado con infrarrojos), es de mayor pureza.



Figura 4.7. Sistema de destilación *sub-boiling* utilizado en el presente trabajo.

Para estudiar las prestaciones de este sistema, se analizaron muestras diluidas al 10% (con agua Milli-Q) del ácido de calidad para análisis de partida, de un ácido de mayor pureza (calidad Suprapur, de Merck) y del obtenido tras la destilación en el sistema descrito.

Como se observa en la Tabla 4.4, el ácido nítrico obtenido posee un contenido considerablemente menor de elementos traza que el de partida (para análisis) e incluso es de mejor calidad que el Suprapur. Conviene destacar que este sistema es también utilizable con otros ácidos usualmente empleados en la preparación de muestras como es el caso del ácido clorhídrico.

Tabla 4.4. Concentración de impurezas metálicas (ng mL<sup>-1</sup>) en los tres tipos de ácido nítrico determinadas semicuantitativamente.

Elemento	HNO <sub>3</sub> para análisis	HNO <sub>3</sub> Suprapur	HNO <sub>3</sub> Sub-boiling
Na	163.00	45.00	38.00
Mg	5.30	1.30	1.6
Al	10.00	10.00	7.9
Ti	0.46	0.44	0.38
V	0.65	0.75	0.58
Cr	0.80	0.48	0.23
Mn	0.38	0.37	0.24
Fe	72.00	61.00	60.00
Ni	0.18	0.59	0.13
Cu	0.74	0.36	0.21
Zn	3.10	2.0	1.8
Nb	<LOD	<LOD	<LOD
Mo	0.02	0.03	0.02
Cd	<LOD	0.05	<LOD
Sn	0.65	0.12	0.04
La	0.02	0.08	0.01
W	<LOD	0.03	0.02
Hg	0.17	0.24	0.15
Pb	0.13	0.53	0.04
U	<LOD	<LOD	<LOD

#### 4.3.2.3. Reactivos

En la síntesis del HAp se empleó nitrato de calcio tetrahidratado (Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, Suprapur), amonio dihidrógeno fosfato (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Suprapur) e hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH, 25%) de Merck.

El HAp comercial, con una pureza del 97% y de grado reactivo analítico, se adquirió en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania).

El agua fue obtenida por un sistema de filtración Milli-Q de Millipore, tal y como se ha explicado en el Capítulo 3.

#### 4.3.2.4. Materiales de Referencia Certificados

El material de referencia de harina de hueso, NIST SRM 1486 Bone Meal, fue suministrado por el National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD, USA). 1 gr del CRM fue prensado en un *pellet* para su análisis por LA-ICP-MS.

#### 4.3.3. Muestras

Las 12 muestras de atún rojo (*Thunnus thynnus*) y las 22 de bonito (*Thunnus alalunga*) examinadas en este estudio se obtuvieron en pescaderías locales entre mayo y junio de 2009. En el mercado ibérico se consume más bonito que atún rojo, motivo por el cual el número de muestras de bonito en el presente trabajo es mayor que el de muestras de atún rojo. La extracción de espinas y tejido de músculo, así como su posterior manipulación, se realizó con cuchillo y pinzas de plástico para evitar una posible contaminación por metales.

Para la extracción de las espinas se siguió el procedimiento representado en la Figura 4.8:

- Se desplegó la primera espina de la primera de la primera aleta dorsal (A).
- Se cortó la membrana entre las dos primeras espinas (B).
- La espina fue inclinada hacia delante (C).
- Se giró la espina sobre sí misma, primero en un sentido y luego en otro hasta romper el tejido conductivo, extrayéndola desde la base en su totalidad (D).

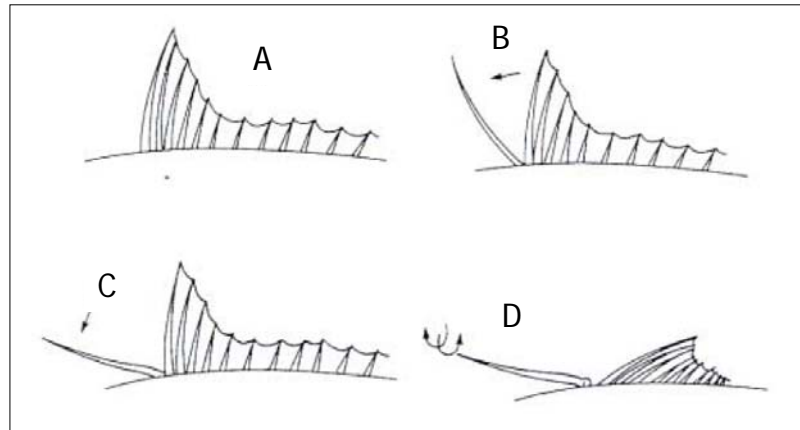


Figura 4.8. Procedimiento de extracción de la primera espina dorsal (Figuras de Compeán-Jiménez<sup>158</sup>)

Una vez extraídas, se les quito la membrana, se limpiaron con agua Milli-Q y se secaron al aire.

Una vez realizados los cortes transversales y montadas las secciones sobre los portaobjetos, la parte restante de cada espina y el tejido de músculo se almacenó a -42 °C, las primeras en sobres de papel y el tejido muscular en los botes de polipropileno anteriormente mencionados.

#### 4.3.4. Limpieza del material

Todo el material de laboratorio se limpió a fondo con el objetivo de minimizar la contaminación. Para ello, en primer lugar se sumergió durante 2-3 días en un baño de ácido nítrico al 15 % y después se aclaró con agua Milli-Q cinco veces. Tras la limpieza, una vez que el material se secó, se guardó en bolsas de plástico dobles hasta su utilización.

#### 4.4. Estudios previos sobre contenidos de elementos traza en tejido muscular y espina: análisis por ICP-MS en disolución

Previamente al desarrollo del método por LA-ICP-MS propiamente dicho, se puso a punto un método por ICP-MS para la cuantificación de 21 elementos en las muestras de la primera espina dorsal y tejido muscular, con el objetivo de tener un conocimiento inicial sobre los contenidos elementales de las muestras a estudiar. La selección de los 21 elementos se llevó a cabo teniendo en cuenta la necesidad de obtener información sobre tres grupos de elementos, contaminantes prioritarios (Cr, Ni, Cu, Zn, As, Se, Cd, Ba, Hg y Pb), contaminantes ambientales emergentes (V, Pd y La) y elementos biológicamente esenciales (B, Mg, Al, Mn, Fe, Co, Rb y Sr), que resultan de interés en los estudios de bioacumulación. Los bajos niveles de concentración que se esperan encontrar en las muestras biológicas, hacen del ICP-MS una técnica muy apropiada para su cuantificación debido a su alta sensibilidad. Para el tratamiento de las muestras se utilizó la digestión asistida por microondas, evaluándose esta etapa mediante análisis por dilución isotópica de varios de los analitos. La elevada concentración de Ca en las muestras de espina impidió la determinación de Fe y Ni en las mismas, debido a fuertes interferencias poliatómicas que no se pudieron resolver mediante ecuaciones de corrección matemáticas.

En este apartado se discuten los aspectos relacionados con este método y se presentan los resultados obtenidos, así como la evaluación de las correlaciones entre los niveles de concentración de los analitos cuantificados en ambas matrices, y las diferencias entre las dos especies analizadas.



#### 4.4.1. Digestión asistida por microondas

El análisis de elementos traza en muestras biológicas mediante ICP-MS requiere una etapa previa de tratamiento de muestra que permita su puesta en disolución. El procedimiento más frecuentemente utilizado ha sido la digestión ácida por vía húmeda, bien con aporte de calor<sup>159-162</sup>, asistido por ultrasonidos<sup>163, 164</sup> o por microondas<sup>165-167</sup>. Habitualmente la digestión ácida asistida por ultrasonidos supone la utilización de volúmenes de ácido menores así como un menor tiempo de análisis en comparación con la digestión ácida en placa calorífica<sup>164</sup>. Sin embargo, existen estudios que demuestran la falta de eficacia de la digestión por ultrasonidos en la extracción de determinados metales<sup>168</sup>, por lo que la utilización de un horno microondas parece ser la opción más adecuada.

En el caso de las estructuras calcáreas como otolitos, escamas y/o espinas, el procedimiento más ampliamente utilizado es la digestión de la muestra con ácido nítrico<sup>131, 169-171</sup>. Gillanders<sup>131</sup> propuso la digestión en ácido nítrico durante toda una noche para otolitos y escamas y durante 36 horas para espinas, mientras que Staniskiene y cols.<sup>170</sup> realizaron la digestión ácida de espinas en horno microondas con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno.

De este modo, en el presente estudio se optó por la digestión ácida asistida por microondas por resultar ésta la técnica más eficaz para la total descomposición de la muestra minimizando la contaminación o la pérdida de analitos. Siguiendo las indicaciones del fabricante del digestor de microondas empleado, se decidió llevar a cabo la digestión según el procedimiento que a continuación se describe:

1. Antes de la pesada, la primera espina de la primera aleta dorsal fue troceada manualmente, los trozos se molieron en un mortero de ágata y se pulverizaron a continuación en un molino de bolas durante 12 horas. En el caso de las muestras de tejido muscular, se trocearon en pedazos pequeños con un cuchillo de plástico antes de ser pesadas.
2. Se pesaron aproximadamente 0.3 g de muestra en microcápsulas de Teflon™.

3. Las microcápsulas fueron introducidas en los vasos de digestión del horno microondas, donde se añadieron los 5 mL de una mezcla  $\text{HNO}_3$  *sub-boiling*: $\text{H}_2\text{O}$  (60:40) asegurando la total cobertura de las muestras y garantizando así una correcta digestión de las mismas.
4. Posteriormente se aplicó el programa de digestión que se recoge en la Tabla 4.5.
5. Tras el enfriamiento de los vasos, su contenido se llevó por pesada a 15 g con agua Milli-Q.

Para las medidas se realizó una dilución final 1:10 en la que se adicionaron los patrones internos, excepto para la cuantificación de Sr y Mg en espinas donde la dilución fue de 1:1000.

Tabla 4.5. Programa de digestión ácida por microondas.

Etapa	Temperatura (°C)	Presión (Bar)	Rampa* (min)	Tiempo (min)	Potencia (%)
1	160	30	5	10	80
2	180	30	5	10	85
3	190	30	3	15	90
4	50	0	1	1	0
5	50	0	1	1	0

\* La rampa hace referencia al tiempo máximo empleado para alcanzar la temperatura de la etapa.

#### 4.4.2. Parámetros de operación del ICP-MS

En la Tabla 4.6 se muestran las condiciones de operación del ICP-MS empleadas para la determinación de los 21 analitos tras la digestión ácida de las muestras. De entre los isótopos monitorizados, tres de ellos se utilizaron como patrones internos para compensar la deriva de la señal y los efectos de matriz: Y para el Cd y los analitos cuya masa es inferior a la de éste, Ce para el Ba y el La, y, por último, Ir para los isótopos del Hg y Pb. Los tres fueron añadidos en una concentración de  $5 \mu\text{g kg}^{-1}$  en las disoluciones de medida.

Tabla 4.6. Condiciones de operación del ICP-MS.

Potencia de radio frecuencia	1500 W
Flujo de gas plasmógeno	15 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas adicional ( <i>Make-up</i> )	0.10- 0.16 L min <sup>-1</sup>
Flujo de gas nebulizador	0.90 L min <sup>-1</sup>
Flujo de He (celda de colisión)	4.5 mL min <sup>-1</sup>
Tipo de nebulizador	MicroMist
Cámara de nebulización	De doble paso de tipo Scott refrigerada a 2 °C
Antorcha	Tipo Fassel Diámetro interno 2.5 mm
Conos	Níquel
Posición en profundidad de la antorcha ( <i>Sampling depth</i> )	6.5- 7 mm
Voltajes de las lentes iónicas	
<i>Extraction lens 1</i>	2 V
<i>Extraction lens 2</i>	140 V
<i>Omega bias</i>	30 V
<i>Omega lens</i>	1 V
<i>Cell input</i>	34 V
<i>QP focus</i>	-12V
<i>Cell output</i>	30 V
<i>Octopole RF</i>	150 V
<i>Octopole bias</i>	-18V
<i>QP bias</i>	-16V
Tiempo de integración por masa	300 ms
Isótopos monitorizados	<sup>10</sup> B, <sup>11</sup> B, <sup>24</sup> Mg, <sup>25</sup> Mg, <sup>26</sup> Mg, <sup>27</sup> Al, <sup>50</sup> V, <sup>51</sup> V, <sup>52</sup> Cr, <sup>53</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>57</sup> Fe, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>61</sup> Ni, <sup>62</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>68</sup> Zn, <sup>75</sup> As, <sup>78</sup> Se, <sup>82</sup> Se, <sup>85</sup> Rb, <sup>86</sup> Sr, <sup>88</sup> Sr, <sup>89</sup> Y, <sup>105</sup> Pd, <sup>111</sup> Cd, <sup>114</sup> Cd, <sup>135</sup> Ba, <sup>137</sup> Ba, <sup>139</sup> La, <sup>140</sup> Ce, <sup>193</sup> Ir, <sup>199</sup> Hg, <sup>200</sup> Hg, <sup>201</sup> Hg, <sup>202</sup> Hg, <sup>206</sup> Pb, <sup>207</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb

Para la cuantificación mediante las calibraciones externas se utilizaron los siguientes isótopos: <sup>11</sup>B, <sup>25</sup>Mg, <sup>27</sup>Al, <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>56</sup>Fe, <sup>59</sup>Co, <sup>60</sup>Ni, <sup>63</sup>Cu, <sup>66</sup>Zn, <sup>75</sup>As, <sup>82</sup>Se, <sup>85</sup>Rb, <sup>88</sup>Sr, <sup>105</sup>Pd, <sup>111</sup>Cd, <sup>137</sup>Ba, <sup>139</sup>La. En el caso del Hg y Pb se sumaron las señales de los isótopos. Para el Hg, con el objetivo de mejorar la estadística del conteo de iones debida a su baja eficiencia de ionización se empleó la Ecuación 4.1.

$$^{202}\text{Hg} = 1 \cdot ^{199}\text{Hg} + 1 \cdot ^{200}\text{Hg} + 1 \cdot ^{201}\text{Hg} + 1 \cdot ^{202}\text{Hg} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

En lo que al Pb se refiere, esta aproximación ayuda a mejorar cualquier error causado por variaciones en el patrón isotópico natural que se observan con frecuencia (Ecuación 4.2).

$$^{208}\text{Pb} = 1 \cdot ^{206}\text{Pb} + 1 \cdot ^{207}\text{Pb} + 1 \cdot ^{208}\text{Pb} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

#### 4.4.3. Evaluación de la digestión asistida por microondas mediante análisis por dilución isotópica

Antes de proceder a la cuantificación de los analitos en las muestras, se evaluó la eficacia del proceso de digestión propuesto mediante análisis por dilución isotópica (ID).

##### 4.4.3.1. Breve introducción al análisis por dilución isotópica<sup>172</sup>

La dilución isotópica es una técnica analítica de elevada exactitud y precisión basada en la medida de las relaciones entre isótopos en muestras donde la composición isotópica ha sido alterada por adición de una cantidad conocida de un elemento enriquecido isotópicamente denominado trazador o *spike*. Ello implica que el elemento a analizar debe presentar al menos dos isótopos estables o de larga vida media radiactiva que puedan ser medidos en un espectrómetro de masas sin interferencias espectrales. En la Figura 4.9 se muestra un esquema del fundamento del análisis por dilución isotópica. Como puede observarse, la abundancia de los dos isótopos y, por tanto, la relación isotópica en la mezcla serán intermedias entre las que presenta el trazador y la muestra y dependerán tanto de la cantidad del trazador añadido como de la cantidad inicial del elemento en la muestra. Así, una vez determinadas las relaciones isotópicas en la mezcla, es posible calcular la concentración del elemento en la muestra en base a una serie de expresiones matemáticas que rigen la dilución isotópica.

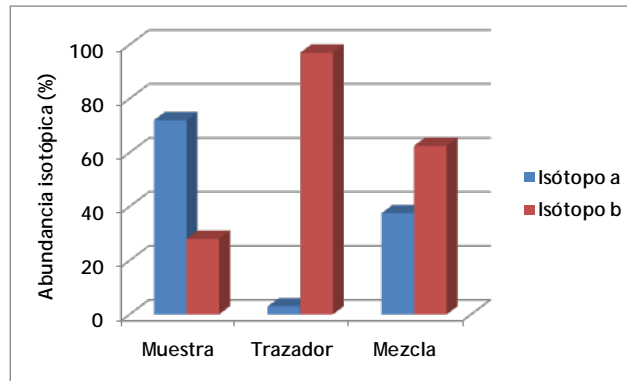


Figura 4.9. Fundamento del análisis por dilución isotópica. Abundancias para un elemento que contiene dos isótopos diferentes (a y b) en: la muestra, el trazador y la mezcla (muestra + trazador).

La ecuación principal que determina la concentración del elemento en la muestra ( $c_s$ ) es la siguiente:

$$c_s = c_{sp} \cdot \frac{m_{sp}}{m_s} \cdot \frac{M_s}{M_{sp}} \cdot \frac{A_{sp}^b}{A_s^a} \cdot \frac{(R_m - R_{sp})}{(1 - R_m \cdot R_s)}$$

Ecuación 4.3

Donde:

- $c_s$  y  $c_{sp}$  son las concentraciones del elemento en la muestra y en el trazador, respectivamente
- $m_s$  y  $m_{sp}$  son las masas iniciales tomadas de la muestra y del trazador, respectivamente
- $M_s$  y  $M_{sp}$  son los pesos atómicos del elemento en la muestra y el trazador, respectivamente
- $A_{sp}^b$  es la abundancia isotópica del isótopo b en el trazador
- $A_s^a$  es la abundancia isotópica del isótopo a en la muestra
- $R_s$ ,  $R_{sp}$  y  $R_m$  son las relaciones isotópicas de ambos isótopos (a/b) en la muestra, en el trazador y en la mezcla de ambos, respectivamente

Al contrario que otras técnicas analíticas, la ecuación anterior no contiene ningún factor relacionado con la sensibilidad instrumental, por lo que no se ve afectada por cambios debidos a deriva instrumental o efectos de matriz. Además, la incertidumbre en la

concentración medida por dilución isotópica depende únicamente de la incertidumbre en la medida de las relaciones isotópicas  $R_s$ ,  $R_{sp}$  y  $R_m$ , ya que los pesos atómicos elementales en la muestra y en el trazador ( $M_s$  y  $M_{sp}$ ) son conocidos y la masa tomada de la muestra y el trazador ( $m_s$  y  $m_{sp}$ ) pueden ser determinadas gravimétricamente. Por tanto, para determinar la concentración de un elemento en una muestra lo más importante es la medida de las relaciones isotópicas, ya que el resto de parámetros serán conocidos o se podrán medir experimentalmente sin dificultad.

Las relaciones isotópicas en la mezcla ( $R_m$ ) se pueden calcular según la siguiente expresión:

$$R_m = \frac{N_m^a}{N_m^b} = \frac{N_s^a + N_{sp}^a}{N_s^b + N_{sp}^b} = \frac{N_s \cdot A_s^a + N_{sp} \cdot A_{sp}^a}{N_s \cdot A_s^b + N_{sp} \cdot A_{sp}^b}$$

Ecuación 4.4

Donde:

- $N_s^a$  y  $N_s^b$  son los moles de los isótopos a y b en la muestra inicial
- $N_{sp}^a$  y  $N_{sp}^b$  son los moles de los isótopos a y b en el trazador
- $N_m^a$  y  $N_m^b$  son los moles de los isótopos a y b en la mezcla
- $N_s$  y  $N_{sp}$  representan el número de moles del elemento poli-isotópico estudiado en la muestra o en el trazador, respectivamente

Así pues, una vez que se ha logrado un completo equilibrio isotópico entre la muestra y el trazador, posibles pérdidas en procedimientos posteriores no afectarán al resultado final. Esto se debe a que cualquier alícuota de la mezcla tendrá la misma relación  $R_m$ .

Cuando se utiliza un ICP-MS para la medida de las intensidades de los isótopos a y b han de tenerse en cuenta los factores que afectan a la obtención de resultados precisos y exactos.

### ***Parámetros que afectan a la exactitud de las medidas de relaciones isotópicas***

Interferencias espectrales. La presencia de iones (mono- o poli-atómicos) con el mismo número másico que uno o ambos isótopos a monitorizar ha de evitarse. En el caso de analizadores cuadrupolares, la utilización de celdas de reacción/colisión es una forma de superar las interferencias espectrales.

Tiempo muerto del detector. Se denomina tiempo muerto del detector al tiempo que necesita el instrumento para la detección y posterior manejo electrónico de la señal, es decir, el intervalo durante el cual el detector es incapaz de resolver pulsos sucesivos. Ese tiempo muerto hace que se den pérdidas en el conteo, pérdidas que aumentan en magnitud a medida que aumenta el rango de cuentas que llegan al detector. Así, si los isótopos se encuentran en abundancias muy diferentes, aquellos con abundancias superiores sufren más el efecto del tiempo muerto. Por ello, es necesario determinar el tiempo muerto del detector con el fin de corregir sus efectos sobre la medida de las relaciones isotópicas. La forma más habitual de calcularlo es midiendo las relaciones isotópicas de un elemento a diferentes concentraciones. Hoy en día algunos equipos, como el ICP-MS de Agilent utilizado en este estudio, permiten calcular e introducir en el software el valor del tiempo muerto del detector de modo que todas las intensidades medidas se corrigen automáticamente.

Discriminación de masa. Los isótopos más pesados se transmiten más eficientemente que los ligeros a lo largo del sistema del ICP-MS. Por consiguiente, las relaciones isotópicas medidas estarán siempre desviadas a favor del isótopo más pesado. Este efecto físico se conoce como efecto de discriminación de masa y causa una desviación de masa que ha de ser corregida. Para la corrección se suelen utilizar estándares cuya composición isotópica se conoce, e implica el cálculo del “factor de discriminación de masa” (*mass bias factor*) por unidad de masa para el intervalo de  $m/z$  de interés. Pueden utilizarse diferentes procedimientos como la calibración con sustancias del mismo elemento o un elemento próximo cuya composición isotópica natural sea consistente, o con materiales de referencia isotópicos, en combinación con varias funciones

matemáticas. En este trabajo se ha utilizado una función matemática lineal para la corrección de la discriminación de masa:

$$R_{\text{corregida}} = \frac{R_{\text{medida}}}{1 + F \cdot \Delta m}$$

Ecuación 4.5

Donde:

- $R_{\text{corregida}}$  es la relación isotópica corregida
- $R_{\text{medida}}$  es la relación isotópica medida experimentalmente
- F es el correspondiente factor de desviación de masa por unidad de masa
- $\Delta m$  es la diferencia de masa entre los isótopos

### ***Parámetros que afectan a la precisión de las medidas de relaciones isotópicas***

Las precisiones obtenidas en la medida de relaciones isotópicas mediante un ICP-MS de cuadrupolo (típicamente con RSDs de 0.1–0.5 %) son normalmente suficientes para determinaciones elementales mediante dilución isotópica. A continuación se explican brevemente los parámetros más relevantes que afectan a la precisión:

Estadística del conteo de iones. La precisión en la medida de relaciones isotópicas está principalmente limitada por la estadística del sistema del conteo de iones, que según la estadística de Poisson, es proporcional a la raíz cuadrada del número total de cuentas medidas. Por ello, en los ICP-MS cuadrupolares, la precisión alcanzable mejora aumentando el tiempo de integración o “*dwell time*” (tiempo empleado en el conteo de iones de una determinada masa) y/o el número de barridos o “*sweeps*” (número de medidas a lo largo del espectro de masas para dar lugar a una sola lectura).

Propagación de errores aleatorios en dilución isotópica. Puede demostrarse que la incertidumbre en la concentración obtenida por un análisis por dilución isotópica es función de la relación isotópica medida  $R_m$  y su incertidumbre en la muestra. Si el resto de fuentes de error son despreciables, el error relativo en la concentración obtenido a partir de la Ecuación 4.3 sigue la siguiente expresión:



$$\left[ \frac{s(C_s)}{C_s} \right] = \left[ \frac{R_m (1 - R_{Sp} \cdot R_S)}{(R_m - R_{Sp}) \cdot (1 - R_m \cdot R_S)} \right] \cdot \left[ \frac{s(R_m)}{R_m} \right]$$

Ecuación 4.6

En donde se relaciona la incertidumbre en la concentración con la incertidumbre en la relación isotópica medida. La función  $[R_m (1 - R_{Sp}R_S)/((R_m - R_{Sp})(1 - R_mR_S))]$  de la Ecuación 4.6 es lo que se conoce como factor de propagación de error,  $f(R)$ , y su valor real depende de  $R_m$ ,  $R_S$  y  $R_{Sp}$  de forma compleja<sup>173</sup>. Puesto que  $R_S$  y  $R_{Sp}$  no pueden optimizarse, sólo se puede modificar  $R_m$ . A fin de minimizar el factor de propagación de error, habrá que optimizar la cantidad de trazador añadido para obtener las relaciones isotópicas adecuadas en la mezcla. Por tanto, se requiere tener un conocimiento previo de la concentración aproximada del elemento en la muestra para seleccionar la cantidad óptima de trazador a añadir. La relación isotópica óptima ( $R_{\text{óptima}}$ ) en la mezcla puede calcularse según la siguiente expresión<sup>174</sup>:

$$R_{\text{óptima}} = \sqrt{\frac{A_{Sp}^1 \cdot A_S^2}{A_{Sp}^2 \cdot A_S^1}}$$

Ecuación 4.7

Donde:

- $A_{Sp}^1$  es la abundancia del isótopo mayoritario en el trazador
- $A_S^2$  es la abundancia del isótopo minoritario en la muestra
- $A_{Sp}^2$  es la abundancia del isótopo minoritario en el trazador
- $A_S^1$  es la abundancia del isótopo mayoritario en la muestra

En consecuencia, la mayor precisión en espectrometría de masas se obtiene cuando los dos isótopos a medir se encuentran en relación 1:1. De todos modos, es conocido que pequeñas desviaciones por factores de 3 o 4 de este óptimo no alteran significativamente la precisión del procedimiento.

#### 4.4.3.2. Cuantificación por dilución isotópica antes y después de la digestión

Dadas las mencionadas características de la dilución isotópica, ésta permite evaluar posibles pérdidas de analito en el tratamiento de muestra cuando se aplica antes y después del mismo.

En este caso, con objeto de estudiar la eficacia del tratamiento de muestra empleado, es decir, de la digestión ácida asistida por microondas, se cuantificaron por dilución isotópica cinco elementos (Cr, Se, Cd, Ba y Pb), los cuales cubren el rango de masas de los analitos. De este modo, se adicionaron los trazadores antes de la digestión (pre-digestión) y después de la misma (post-digestión), y se compararon los resultados. Los análisis se realizaron por triplicado. Las abundancias isotópicas de los trazadores empleados así como las abundancias naturales de los mismos para los isótopos de interés se recogen en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Abundancias isotópicas de los isótopos naturales y de los trazadores empleados para el análisis por dilución isotópica.

Analito	Abundancias isotópicas naturales	Abundancias isotópicas en los trazadores
<b>Cr</b>	83.79% <sup>52</sup> Cr	6.45% <sup>52</sup> Cr
	9.50% <sup>53</sup> Cr	92.73% <sup>53</sup> Cr
<b>Se</b>	7.63% <sup>77</sup> Se	94.89% <sup>77</sup> Se
	23.77% <sup>78</sup> Se	2.92% <sup>78</sup> Se
<b>Cd</b>	12.80% <sup>111</sup> Cd	96.16% <sup>111</sup> Cd
	24.13% <sup>112</sup> Cd	2.00% <sup>112</sup> Cd
<b>Ba</b>	6.59% <sup>135</sup> Ba	93.38% <sup>135</sup> Ba
	11.23% <sup>137</sup> Ba	0.89% <sup>137</sup> Ba
<b>Pb</b>	22.10% <sup>207</sup> Pb	94.71% <sup>207</sup> Pb
	52.40% <sup>208</sup> Pb	2.90% <sup>208</sup> Pb

Para llevar a cabo la dilución isotópica antes de la digestión, a los aproximadamente 0.3 g de muestra (espina pulverizada o tejido muscular triturado) se le añadió un volumen de disolución "A" de trazador multielemento (50.1 µg kg<sup>-1</sup> de Cr, 1012.2 µg kg<sup>-1</sup> de Se, 28.2 µg kg<sup>-1</sup> de Cd, 665.0 µg kg<sup>-1</sup> de Ba y 42.3 µg kg<sup>-1</sup> de Pb) y se dejó reposar 2 horas

para que se alcanzara el equilibrio isotópico entre la muestra y el trazador. Las concentraciones de los trazadores enriquecidos en esta disolución y los volúmenes de trazador a añadir se calcularon en base a una cuantificación previa por calibración externa de los analitos en la muestra, de modo que la relación muestra/trazador se situara en torno a la  $R_{\text{óptima}}$ . Posteriormente, la mezcla de muestra y trazador se sometió a la digestión ácida en el horno microondas según el procedimiento previamente descrito, para finalmente medir las relaciones isotópicas por ICP-MS. Un esquema del procedimiento para ambas matrices se recoge en la Figura 4.10a.

Para el estudio post-digestión, 0.3 g de muestra (espina pulverizada o tejido muscular triturado) fueron digeridos siguiendo el procedimiento descrito. Una vez realizada la dilución final, se mezcló 5 g de disolución "B" de trazador multielemento (correspondiente a una dilución 1/500 de la disolución de trazadores "A") con una alícuota de 5 g de la muestra digerida y diluida. De este modo, de nuevo la relación muestra/trazador se situó en torno a la  $R_{\text{óptima}}$ . Un esquema del procedimiento para ambas matrices se recoge en la Figura 4.10b.

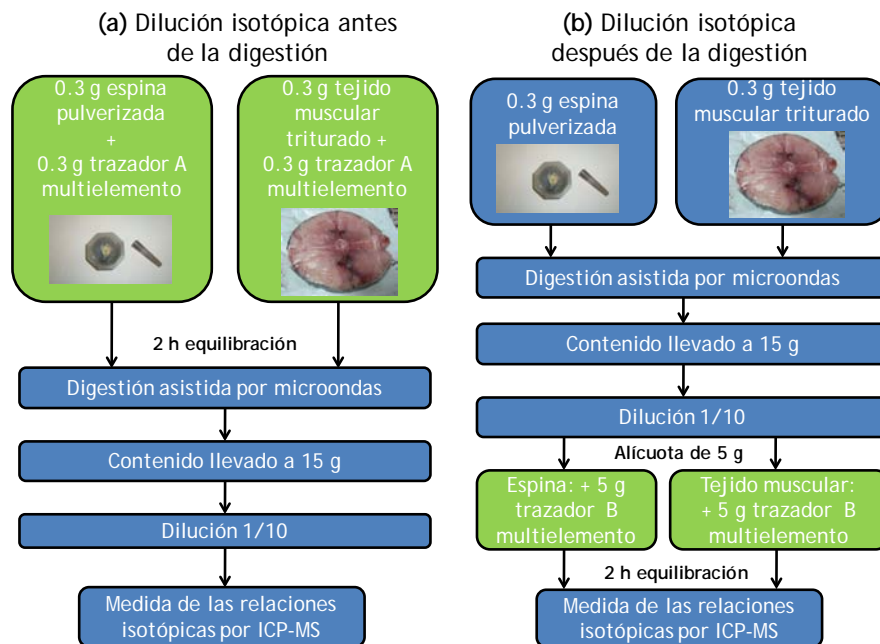


Figura 4.10. Esquema de los procedimientos por dilución isotópica: (a) ID antes de la digestión; (b) ID después de la digestión. La etapa de dopaje con los trazadores marcados se representa en verde.

Para la cuantificación por dilución isotópica se utilizaron los siguientes isótopos:  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{53}\text{Cr}$ ,  $^{77}\text{Se}$ ,  $^{78}\text{Se}$ ,  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{112}\text{Cd}$ ,  $^{135}\text{Ba}$ ,  $^{137}\text{Ba}$ ,  $^{207}\text{Pb}$  y  $^{208}\text{Pb}$ . Además, también se adquirió la señal a la  $m/z$  118 del Sn para corregir el solapamiento isobárico del  $^{112}\text{Sn}$  en el  $^{112}\text{Cd}$ , que se corrigió en base a la siguiente ecuación matemática:

$$I(^{112}\text{Cd}) = 1 \cdot I(^{112}\text{Medida}) - 4.004 \text{ E-}02 \cdot I(^{118}\text{Sn}) \quad \text{Ecuación 4.8}$$

Se utilizó un tiempo de integración de 0.2 s para todos los isótopos y se midieron tres réplicas de cada muestra. Para el cálculo del tiempo muerto del detector se emplearon dos disoluciones de Er de 20 y 500  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Una vez calculado, la corrección del mismo fue realizada automáticamente por el software del instrumento. Antes y después de cada muestra se midió una disolución patrón multielemento de los 5 analitos con abundancias naturales de 10  $\text{ng g}^{-1}$  para calcular el factor de discriminación de masa mediante el modelo lineal (utilizando la Ecuación 4.5). Este valor se utilizó para el cálculo de las relaciones isotópicas corregidas en la mezcla. Finalmente, se calculó la concentración de los analitos aplicando la ecuación principal de la dilución isotópica (Ecuación 4.3).

Los resultados para las cuantificaciones por dilución isotópica en ambos casos se recogen en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Concentración de metales en espinas y tejido muscular cuantificadas mediante dilución isotópica pre-digestión y post-digestión (n= 3).

Tejido	Tipo de ID	Analito [Media $\pm$ RSD (%)] ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )				
		Cr	Se	Cd	Ba	Pb
Espina dorsal	Pre-digestión	100.3 $\pm$ 5.9	734.6 $\pm$ 1.2	50.9 $\pm$ 1.9	1752.9 $\pm$ 3.3	69.5 $\pm$ 0.4
	Post-digestión	96.8 $\pm$ 4.0	737.8 $\pm$ 0.2	51.1 $\pm$ 4.9	1652.0 $\pm$ 0.3	65.5 $\pm$ 6.0
Tejido muscular	Pre-digestión	65.1 $\pm$ 5.8	1505.0 $\pm$ 0.8	16.9 $\pm$ 1.7	123.5 $\pm$ 3.7	17.0 $\pm$ 3.1
	Post-digestión	68.2 $\pm$ 0.8	1560.4 $\pm$ 4.2	18.6 $\pm$ 5.9	122.6 $\pm$ 4.1	16.4 $\pm$ 4.1

Para evaluar si los resultados obtenidos adicionando el trazador antes y después de la digestión eran significativamente diferentes o no, se aplicó el test t de Student de dos

muestras. Previamente se comprobó si había o no homogeneidad de varianzas por medio de un test F de dos colas. El valor calculado de  $F$  se define como:

$$F_{\text{cal}} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Ecuación 4.9

Dado que convencionalmente los valores tabulados de  $F$  son siempre superiores a uno, se sitúa siempre en el numerador la varianza ( $s^2$ ) mayor. Para comprobar que existe homogeneidad de varianzas, se recurre a valores tabulados de  $F$  (valores críticos) para un cierto nivel de significación. Si  $F_{\text{cal}} < F_{\text{crítico}}$  hay homogeneidad de varianzas en ambos conjuntos (no hay diferencias significativas entre las varianzas). Si  $F_{\text{cal}} > F_{\text{crítico}}$  no hay homogeneidad de varianzas.

En los casos en los que se comprobó la homogeneidad de varianzas, el test t de dos muestras se llevó a cabo calculando el valor de t mediante la siguiente expresión:

$$t_{\text{cal}} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s/\sqrt{n}}$$

Ecuación 4.10

Donde  $\bar{X}_1$  y  $\bar{X}_2$  son los valores medios de las dos muestras y  $n$  el número de medidas utilizadas en el cálculo de las medias. El valor de  $s$  es una ponderación entre las desviaciones estándar de los dos conjuntos de resultados que se comparan, calculada mediante la ecuación:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$$

Ecuación 4.11

Para  $n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad (g.l.).

En los casos en los que no existe homogeneidad de varianzas, las expresiones anteriores se modifican para tener en cuenta la varianza de cada serie de resultados. Así, el valor de t se calcula según la siguiente expresión:

$$t_{\text{cal}} = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right) + \left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)}}$$

Ecuación 4.12

Y los grados de libertad son ahora:

$$g. l. = \frac{(s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2}{(s_1^2/n_1)^2/(n_1 + 1) + (s_2^2/n_2)^2/(n_2 + 1)} - 2$$

Ecuación 4.13

Independientemente de la fórmula utilizada para calcular  $t_{\text{cal}}$ , los valores obtenidos se comparan con valores tabulados para un determinado nivel de confianza. Si  $t_{\text{cal}} < t_{\text{crítico}}$ , se concluye (con el nivel de confianza correspondiente) que no hay diferencias significativas entre ambos resultados.

En este caso, la homogeneidad de varianzas se confirmó para todos los casos excepto en tres: para el análisis de Cr y Cd en tejido muscular, y para los análisis de Ba y Pb en espina. Por consiguiente el valor de  $t_{\text{cal}}$  se calculó con la ecuación correspondiente en cada caso. En los casos en los que no se comprobó la homogeneidad de varianzas se calcularon también los grados de libertad de acuerdo a la Ecuación 4.13, resultando en todos los casos 2 grados de libertad. Como se observa en la Tabla 4.9, los valores calculados de  $t$  se encontraron entre 0.18 y 4.13, por debajo de los valores críticos correspondientes ( $t_{\text{crítico}} = 4.3$ , para  $p < 0.05$  y 2 grados de libertad, en el caso de inhomogeneidad de varianzas; y  $t_{\text{crítico}} = 2.78$ , para  $p < 0.05$  y 4 grados de libertad en el caso de homogeneidad de varianzas), lo que confirmó la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los resultados con ambos métodos de cuantificación. Por lo tanto, puede concluirse que en el procedimiento de digestión no se da contaminación ni pérdida de analitos, y que el tratamiento de muestra propuesto es efectivo para la digestión de espinas y tejido muscular.

Tabla 4.9. Valores de  $t_{cal}$  para los resultados obtenidos por dilución isotópica pre-digestión y post-digestión en espina dorsal y tejido muscular.

Tejido	Valores $t_{cal}$				
	Cr	Se	Cd	Ba	Pb
Espina dorsal	1.22	0.88	0.18	3.01	1.76
Tejido muscular	1.41	2.04	4.13	0.32	1.72

#### 4.4.4. Corrección de interferencias: Evaluación del empleo de ecuaciones matemáticas

El mayor inconveniente de la digestión de estructuras calcáreas, como es el caso de las espinas, son las altas concentraciones de Ca en la disolución de digestión, lo que dificulta la cuantificación posterior de ciertos elementos minoritarios. De los 21 analitos de este estudio, la determinación de dos de ellos, Fe y Ni, se ve seriamente afectada por la formación de óxidos e hidróxidos de Ca, aún empleando la celda de colisión/reacción. Como se recoge en la Tabla 4.10, todos los isótopos libres de interferencias isobáricas de ambos analitos están interferidos por especies de óxidos o hidróxidos de Ca.

Tabla 4.10. Interferencias potenciales de óxidos e hidróxidos de Ca en isótopos de Fe y Ni.

m/z	Elemento (Abundancia natural, %)	Interferencias en matriz de Ca
56	Fe (91.75)	$^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$
57	Fe (2.12)	$^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$
60	Ni (26.22)	$^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$ , $^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}$
61	Ni (1.14)	$^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$
62	Ni (3.63)	$^{46}\text{Ca}^{16}\text{O}$

En las muestras de espina dorsal de atún y bonito la concentración de Ca es de aproximadamente el 20%. En consecuencia, la concentración de Ca en las disoluciones de medida (tras la digestión y dilución de las muestras) se sitúa alrededor de  $1300 \mu\text{g g}^{-1}$ . En la Figura 4.11 se muestra un espectro de masas típico en la región de masas 56-62 para una disolución de  $1000 \mu\text{g g}^{-1}$  de Ca junto con el correspondiente a una disolución de 4 ppb de Ni y Fe, que deja de manifiesto la magnitud de las interferencias de óxidos e hidróxidos de Ca en los isótopos de Fe y Ni.

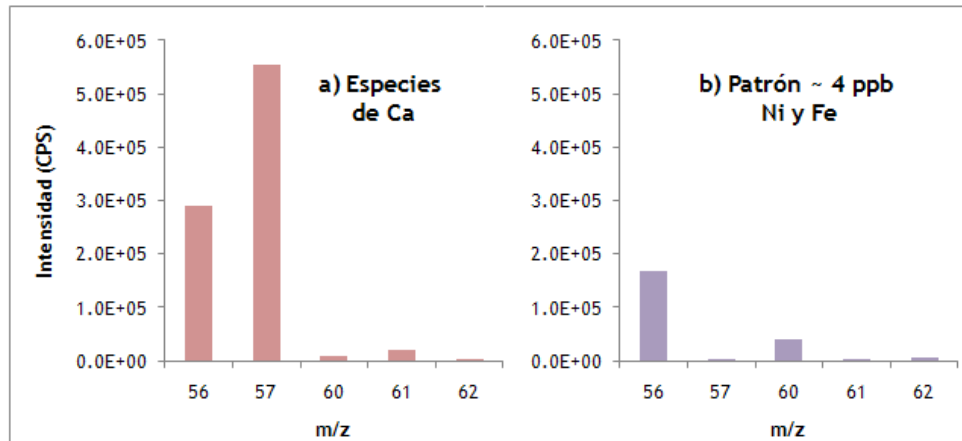


Figura 4.11. Espectro de masas de disoluciones de: a)  $1000 \mu\text{g g}^{-1}$  de Ca; b)  $\sim 4$  ppb de Ni y Fe. Condiciones de operación de ICP-MS según Tabla 4.6.

Como posible estrategia para la supresión de estas interferencias derivadas de la alta concentración de Ca se investigó la utilización de correcciones matemáticas. Éstas se basan en la medida de una disolución patrón de Ca (en la que también se añade una concentración determinada de Ce) para calcular los denominados factores de formación de óxidos ( $f_{\text{CaO}}$ ) e hidróxidos de Ca ( $f_{\text{CaOH}}$ ). Tras el cálculo independiente de estos factores, se puede calcular la señal real del elemento interferido en cada muestra (en las que se añade Ce en la misma concentración que en el patrón de Ca). A modo de ejemplo, se muestran las ecuaciones para la corrección de las interferencias de óxidos de Ca en la señal del  $^{56}\text{Fe}$ :

$$I_{56_{\text{Fe}}} = I_{56_{\text{S}}} - \left[ I_{43_{\text{Ca}_{\text{S}}}} \cdot f_{\text{CaO}} \cdot \frac{I_{156_{\text{CeO}_{\text{S}}}}}{I_{140_{\text{Ce}_{\text{S}}}}} \right]$$

Ecuación 4.14

Donde:

- $I_{56_{\text{Fe}}}$  es la señal corregida de Fe en la muestra
- $I_{56_{\text{S}}}$  es la señal interferida (medida) de Fe en la muestra
- $I_{43_{\text{Ca}_{\text{S}}}}$  es la señal del  $^{43}\text{Ca}$  en la muestra
- $f_{\text{CaO}}$  es el factor de corrección de óxidos de Ca, calculado independientemente
- $I_{156_{\text{CeO}_{\text{S}}}}$  y  $I_{140_{\text{Ce}_{\text{S}}}}$  son las señales de  $^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}$  y  $^{140}\text{Ce}$  en la muestra



En este caso el factor de corrección  $f_{CaO}$  se calcula en una disolución patrón de Ca y Ce siguiendo la expresión:

$$f_{CaO} = \frac{\left( \frac{I_{56\_CaO}}{I_{43\_Ca}} \right)}{\left( \frac{I_{156\_CeO}}{I_{140\_Ce}} \right)}$$

Ecuación 4.15

Donde:

- $I_{56\_CaO}$  es la señal de  $^{40}Ca^{16}O$  en el patrón
- $I_{43\_Ca}$  es la señal de  $^{43}Ca$  en el patrón
- $I_{156\_CeO}$  es la señal de  $^{140}Ce^{16}O$  en el patrón
- $I_{140\_Ce}$  es la señal de  $^{140}Ce$  en el patrón

Para evaluar la utilidad de estas ecuaciones y las análogas para el  $^{57}Fe$ ,  $^{60}Ni$ ,  $^{61}Ni$  y  $^{62}Ni$  en el análisis de las espinas, se prepararon disoluciones patrón de Ni y Fe a nivel de  $ng\ g^{-1}$  con un contenido de Ca elevado ( $\sim 1000\ \mu g\ g^{-1}$ ) y se calculó su concentración mediante calibración externa tras aplicar las ecuaciones matemáticas. Para este estudio se preparó un calibrado en ácido nítrico al 1% y se utilizó Y como patrón interno. Sin embargo, tal y como se recoge en la Tabla 4.11, no se consiguieron corregir por completo las interferencias.

Tabla 4.11. Resultados obtenidos para el análisis de dos patrones de Fe y Ni en una matriz con elevada concentración de Ca sin realizar corrección y tras la aplicación de las ecuaciones matemáticas descritas para la corrección de interferencias de Ca. Concentraciones en  $ng\ g^{-1}$ .

Patrón a analizar	Concentraciones calculadas sin corrección					Concentraciones corregidas				
	$^{56}Fe$	$^{57}Fe$	$^{60}Ni$	$^{61}Ni$	$^{62}Ni$	$^{56}Fe$	$^{57}Fe$	$^{60}Ni$	$^{61}Ni$	$^{62}Ni$
P1 <sup>a</sup>	65.5	1782	1.90	95.5	0.50	48.2	274	0.08	6.85	-0.12
P2 <sup>b</sup>	107.2	1693	1.74	0.31	0.69	95.3	38.3	0.13	-1.82	0.28

<sup>a</sup> P1: [Ca]= 920  $\mu g\ g^{-1}$ ; [Fe]= 42.4  $ng\ g^{-1}$ ; [Ni]= 0.24  $ng\ g^{-1}$

<sup>b</sup> P2: [Ca]= 858  $\mu g\ g^{-1}$ ; [Fe]= 87.2  $ng\ g^{-1}$ ; [Ni]= 0.44  $ng\ g^{-1}$

Como alternativa a la poca eficacia de la utilización de algoritmos matemáticos para la corrección de interferencias, se han descrito<sup>171</sup> otras metodologías como pueden ser la utilización de minicolumnas rellenas de resinas quelantes que permiten la eliminación de elementos como el Ca. No obstante, estos sistemas aumentan considerablemente el tiempo de análisis e introducen otro tipo de incertidumbres en la cuantificación. Por todo ello y dadas las dificultades encontradas, se decidió prescindir de la cuantificación de Fe y Ni, asumiendo que a pesar de que son dos elementos que pueden aportar datos importantes en los estudios de bioacumulación, su evaluación puede resultar errónea y se dispone de suficientes datos de otros analitos que garantizan la validez del estudio.

#### 4.4.5. Evaluación analítica del método por ICP-MS

Una vez verificada la eficacia del procedimiento de digestión y descartada la posibilidad de determinar Ni y Fe en espinas, se llevó a cabo la evaluación analítica del método de ICP-MS en términos de linealidad, límites de cuantificación, exactitud y precisión.

##### 4.4.5.1. Calibrado del método

Para la cuantificación fiable de los analitos en las muestras se llevó a cabo un calibrado en matriz y se utilizaron <sup>89</sup>Y, <sup>140</sup>Ce y <sup>193</sup>Ir como patrones internos. El calibrado en matriz se preparó en una mezcla de tejido muscular o espinas procedentes de diferentes muestras, diluida al mismo nivel que las muestras objeto de estudio. Para la cuantificación de los analitos, las muestras se diluyeron 1/10 tras la digestión, excepto para la cuantificación de Mg y Sr en espinas, para las que la dilución fue de 1/100. En la Tabla 4.12 se muestran las pendientes y los coeficientes de correlación de las rectas de calibrado y los rangos de concentración añadidos. Como se observa, en espinas para la mayoría de los elementos objeto de estudio el coeficiente de correlación fue superior a 0.995, exceptuando el Cr y el Cu que presentaron coeficientes de correlación más bajos. En el caso del tejido muscular, los coeficientes de correlación se situaron en todos los casos por encima de 0.9985.

Tabla.4.12. Valor de las pendientes, coeficientes de correlación (r) y rangos de concentración añadidos de las rectas de calibrado en matriz por ICP-MS.

Analito	Espina dorsal			Tejido muscular				
	Pendiente	r	Rango de conc. añadida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		Pendiente	r	Rango de conc. añadida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
			Min	Max			Min	Max
<sup>11</sup> B	$5.98 \times 10^{-3}$	0.9980	2.0	30.0	$5.00 \times 10^{-3}$	0.9998	0.20	30.0
<sup>25</sup> Mg	$8.58 \times 10^{-3}$	0.9999	5.0	300.0 <sup>b</sup>	$4.44 \times 10^{-1}$	0.9999	0.20	30.0
<sup>27</sup> Al	$2.70 \times 10^{-2}$	0.9950	2.0	30.0	$2.62 \times 10^{-2}$	0.9997	3.0	30.0
<sup>51</sup> V	$4.32 \times 10^{-1}$	0.9998	0.50	30.0	$3.84 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01	30.0
<sup>52</sup> Cr	$4.99 \times 10^{-1}$	0.9645	0.05	30.0	$4.41 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01	30.0
<sup>55</sup> Mn	$4.61 \times 10^{-1}$	0.9989	4.0	30.00	$4.09 \times 10^{-1}$	1.0000	0.05	30.0
<sup>56</sup> Fe	a				$4.56 \times 10^{-1}$	0.9994	3.0	30.0
<sup>59</sup> Co	$6.77 \times 10^{-1}$	0.9992	0.02	30.00	$6.33 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01	30.0
<sup>60</sup> Ni	a				$1.54 \times 10^{-1}$	1.0000	0.05	30.0
<sup>63</sup> Cu	$4.01 \times 10^{-1}$	0.9714	0.08	30.0	$3.79 \times 10^{-1}$	1.0000	0.05	30.0
<sup>66</sup> Zn	$7.36 \times 10^{-2}$	0.9997	10.0	300.0	$7.01 \times 10^{-2}$	0.9986	10.0	30.0
<sup>75</sup> As	$6.21 \times 10^{-2}$	0.9999	0.50	30.0	$5.60 \times 10^{-2}$	1.0000	3.0	30.0
<sup>82</sup> Se	$4.01 \times 10^{-3}$	1.0000	0.8	30.0	$4.09 \times 10^{-3}$	1.0000	1.0	30.0
<sup>85</sup> Rb	$5.06 \times 10^{-1}$	1.0000	0.05	30.0	$4.85 \times 10^{-1}$	1.0000	1.0	30.0
<sup>88</sup> Sr	$7.14 \times 10^{-2}$	0.9999	1.00	300.0 <sup>b</sup>	$6.27 \times 10^{-1}$	1.0000	1.0	30.0
<sup>105</sup> Pd	$1.46 \times 10^{-1}$	0.9995	0.10	30.0	$2.10 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01	30.0
<sup>111</sup> Cd	$1.01 \times 10^{-1}$	0.9993	0.03	30.0	$1.10 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01	30.0
<sup>137</sup> Ba	$9.39 \times 10^{-2}$	1.0000	2.0	30.0	$5.45 \times 10^{-2}$	1.0000	0.20	30.0
<sup>139</sup> La	$1.72 \times 10^{+0}$	0.9988	0.005	30.0	$9.54 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01	30.0
<sup>201</sup> Hg	$2.63 \times 10^{-2}$	0.9986	0.01	30.0	$3.43 \times 10^{-2}$	0.9997	0.05	30.0
<sup>208</sup> Pb	$1.61 \times 10^{+0}$	0.9997	0.03	30.0	$1.40 \times 10^{+0}$	1.0000	0.01	30.0

<sup>a</sup> El Fe y Ni en las muestras de espina no se cuantificaron.

<sup>b</sup> Calibrado llevado cabo en una mezcla de diferentes espinas digeridas y diluidas 1:1000.

#### 4.4.5.2. Límites de cuantificación

Los límites de cuantificación, definidos como la mínima concentración de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión, se calcularon de acuerdo a las pautas establecidas por la Unión Europea<sup>175</sup> como la mínima concentración de la recta de calibrado a la cual el coeficiente de variación es menor al 20% y la precisión está entre el 70 y el 120 %. En ausencia de una matriz libre de analito, estos valores se calcularon en disoluciones patrón preparadas en ácido nítrico *sub-boiling* al 1%. Los valores se muestran en la Tabla 4.13, indicándose entre paréntesis la

concentración equivalente en muestra, teniendo en cuenta el factor de dilución de las mismas.

Tabla 4.13. Valores de los límites de cuantificación de los analitos objeto de estudio calculados de acuerdo a los criterios de la Unión Europea (UE), entre paréntesis se indica la concentración equivalente en muestras.

Analito	LOQ en $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Concentración equivalente en muestras en $\text{mg kg}^{-1}$ )
<sup>11</sup> B	0.20 (0.1)
<sup>25</sup> Mg	0.10 (0.05 y 5*)
<sup>27</sup> Al	1.00 (0.5)
<sup>51</sup> V	0.005 (0.0025)
<sup>52</sup> Cr	0.05 (0.025)
<sup>55</sup> Mn	0.05 (0.025)
<sup>56</sup> Fe	1.00 (0.5)
<sup>59</sup> Co	0.002 (0.001)
<sup>60</sup> Ni	0.05 (0.025)
<sup>63</sup> Cu	0.05 (0.025)
<sup>66</sup> Zn	0.20 (0.1)
<sup>75</sup> As	0.005 (0.0025)
<sup>82</sup> Se	0.20 (0.1)
<sup>85</sup> Rb	0.002 (0.001)
<sup>88</sup> Sr	0.20 (0.1 y 10*)
<sup>105</sup> Pd	0.02 (0.01)
<sup>111</sup> Cd	0.02 (0.01)
<sup>137</sup> Ba	0.01 (0.005)
<sup>139</sup> La	0.005 (0.0025)
<sup>201</sup> Hg	0.01 (0.005)
<sup>208</sup> Pb	0.01 (0.005)

\* Concentración equivalente en muestras de espigas.

#### 4.4.5.3. Exactitud

Para evaluar la exactitud del método, se analizó por quintuplicado el material de referencia "NIST SRM 1486 Bone Meal" de harina de hueso (también HAp), ya que esta matriz requiere unas condiciones de digestión más agresivas en las que la total digestión del tejido muscular está garantizada. Los resultados obtenidos para los cuatro analitos de este estudio que están certificados en el SRM 1486 (Mg, Zn, Sr y Pb) junto con otros analitos para los que se dispone de valores de referencia, se recogen en la Tabla 4.14.

Como se observa, estos resultados se encuentran dentro de los rangos establecidos<sup>175</sup>, con recuperaciones entre el 70 y el 120%, y permiten por tanto confirmar la validez del método desarrollado para estos analitos.

Tabla 4.14. Resultados del análisis cuantitativo del "SRM 1486 Bone Meal" mediante ICP-MS. Concentraciones en  $\mu\text{g g}^{-1}$  e incertidumbre asociada a un intervalo de confianza del 95%.

Analito	Valores de referencia ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Concentraciones determinadas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , n =5)
Mg	4660 $\pm$ 170 <sup>a</sup>	4474 $\pm$ 117
Al	<1 <sup>b</sup>	1.4 $\pm$ 0.2
V	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.057 $\pm$ 0.004
Mn	1 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.09
Co	0.11 <sup>c</sup>	0.090 $\pm$ 0.004
Cu	0.8 <sup>b</sup>	0.94 $\pm$ 0.06
Zn	147 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	125 $\pm$ 2
As	0.006 <sup>b</sup>	0.007 $\pm$ 0.002
Sr	264 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	279 $\pm$ 8
Cd	0.003 <sup>b</sup>	< LOQ
Ba	270 $\pm$ 7 <sup>c</sup>	267 $\pm$ 3
Hg	<0.05 <sup>d</sup>	0.06 $\pm$ 0.01
Pb	1.335 $\pm$ 0.014 <sup>a</sup>	1.4 $\pm$ 0.1

<sup>a</sup> Valores certificados proporcionados por el NIST.

<sup>b</sup> Valores no certificados proporcionados por el NIST.

<sup>c</sup> De Zaichick y cols.<sup>176</sup>

<sup>d</sup> De Dolan y cols.<sup>177</sup>

#### 4.4.5.4. Precisión

Por último, la precisión del método fue evaluada en términos de repetitividad mediante el análisis de la misma mezcla (*pool*) de muestra en el día y entre días.

La *repetitividad en el día* estudia la variabilidad del método propuesto en los análisis realizados dentro del mismo día. Para su estimación se realizaron 5 medidas a lo largo de un mismo día. La *repetitividad entre días* permite estimar la variabilidad del método analítico propuesto en un período de tiempo, que, en este caso, abarca una semana. Para su estimación se repite el mismo proceso que para la repetitividad en el día pero a lo largo de 5 días.

Los valores de la desviación estándar relativa (RSD) están recogidos en la Tabla 4.15. Las RSDs obtenidas, inferiores al 12% en todos los casos, cumplen las pautas establecidas por la Unión Europea<sup>175</sup>.

Tabla 4.15. Repetitividad del método en el día y entre días (n = 5) expresada como la desviación estándar relativa (RSD).

Analito	Espina dorsal		Tejido muscular	
	En el día	Entre días	En el día	Entre días
<sup>11</sup> B	10.9	3.7	9.4	8.1
<sup>25</sup> Mg	2.8	2.7	4.0	4.8
<sup>27</sup> Al	10.3	4.3	1.4	4.8
<sup>51</sup> V	6.5	3.2	3.5	4.3
<sup>52</sup> Cr	5.3	3.1	3.2	7.8
<sup>55</sup> Mn	6.9	0.7	2.8	4.4
<sup>56</sup> Fe	-	-	3.1	4.2
<sup>59</sup> Co	7.8	2.4	0.6	6.1
<sup>60</sup> Ni	-	-	11.3	5.2
<sup>63</sup> Cu	2.7	4.4	1.1	3.1
<sup>66</sup> Zn	3.3	4.5	1.0	8.8
<sup>75</sup> As	8.1	1.6	5.5	1.8
<sup>82</sup> Se	6.4	8.4	4.8	4.6
<sup>85</sup> Rb	3.7	1.4	3.7	1.3
<sup>88</sup> Sr	2.3	2.6	0.1	1.6
<sup>105</sup> Pd	0.1	8.4	1.7	7.2
<sup>111</sup> Cd	1.9	9.6	2.5	6.7
<sup>137</sup> Ba	5.2	1.5	5.1	7.4
<sup>139</sup> La	1.5	7.1	8.1	7.8
<sup>201</sup> Hg	5.3	9.4	1.0	4.1
<sup>208</sup> Pb	6.1	3.0	0.6	5.9

#### 4.4.6. Evaluación de los contenidos metálicos en las muestras reales

El método desarrollado se aplicó al análisis de los analitos en las muestras de la primera espina de la primera aleta dorsal y tejido muscular de bonito (*Thunnus alalunga*) y atún rojo (*Thunnus thynnus*). Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.16 para el bonito, y en la 4.17 para el atún.

**Tabla 4.16.** Concentraciones medias, máximas y mínimas ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y RSD (%) de los analitos en tejido muscular (en peso húmedo) y en la primera espina dorsal de bonito. (Nº de muestras: 22)

Analito	Espina dorsal				Tejido muscular			
	Media	Max	Min	RSD (%)	Media	Max	Min	RSD (%)
$^{11}\text{B}$	4.6	8.3	3.1	26.7	0.44	1.3	0.20	64.1
$^{25}\text{Mg}$	2834	3230	2011	12.1	288	359	214	13.4
$^{27}\text{Al}$	3.6	6.2	2.1	31.2	1.9	4.2	1.0	50.0
$^{51}\text{V}$	0.35	0.52	0.16	29.9	0.004	0.010	0.002	32.3
$^{52}\text{Cr}$	0.12	0.31	0.05	57.1	0.02	0.03	0.02	16.2
$^{55}\text{Mn}$	9.7	13.6	5.6	23.7	0.10	0.12	0.08	13.5
$^{56}\text{Fe}$					7.3	16.2	3.7	41.3
$^{59}\text{Co}$	0.09	0.16	0.06	25.3	0.005	0.01	0.004	21.6
$^{60}\text{Ni}$					0.04	0.14	0.02	58.6
$^{63}\text{Cu}$	0.86	1.8	0.40	42.7	0.51	0.71	0.42	14.4
$^{66}\text{Zn}$	69.7	128	38.4	26.5	15.3	41.0	6.7	68.3
$^{75}\text{As}$	0.73	1.5	0.27	42.0	1.5	2.2	0.83	26.6
$^{82}\text{Se}$	0.57	1.1	0.35	25.7	1.2	1.8	0.87	22.0
$^{85}\text{Rb}$	0.20	0.32	0.15	20.5	0.55	0.67	0.33	13.8
$^{88}\text{Sr}$	675	874	505	12.9	0.62	0.95	0.36	25.2
$^{105}\text{Pd}$	1.21	1.38	0.95	9.6	0.02	0.02	0.02	6.3
$^{111}\text{Cd}$	0.05	0.09	0.02	37.8	0.01	0.03	0.004	49.9
$^{137}\text{Ba}$	1.6	3.7	1.0	49.3	0.13	0.52	0.02	110.4
$^{139}\text{La}$	0.04	0.15	0.003	130.9	0.01	0.01	0.002	51.9
$^{201}\text{Hg}$	0.10	0.28	0.05	59.7	0.48	1.3	0.22	71.2
$^{208}\text{Pb}$	0.25	0.60	0.04	60.6	0.02	0.04	0.01	39.6

Tabla 4.17. Concentraciones medias, máximas y mínimas ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) y RSD (%) de los analitos en tejido muscular (en peso húmedo) y en la primera espina dorsal de atún rojo. (Número de muestras: 12)

Analito	Espina dorsal				Tejido muscular			
	Media	Max	Min	RSD (%)	Media	Max	Min	RSD (%)
<sup>11</sup> B	6.1	12.1	3.3	42.4	0.55	0.88	0.28	38.0
<sup>25</sup> Mg	2720	3244	2194	11.1	305	388	250	16.2
<sup>27</sup> Al	4.8	9.1	2.7	49.9	2.1	4.04	0.74	53.2
<sup>51</sup> V	0.25	0.38	0.14	32.2	0.005	0.008	0.003	35.8
<sup>52</sup> Cr	0.06	0.13	0.03	47.9	0.03	0.04	0.02	21.6
<sup>55</sup> Mn	6.6	11.2	3.81	40.1	0.09	0.11	0.06	18.9
<sup>56</sup> Fe					8.4	11.8	6.1	21.6
<sup>59</sup> Co	0.07	0.10	0.04	21.9	0.005	0.006	0.003	18.4
<sup>60</sup> Ni					0.05	0.14	0.03	67.3
<sup>63</sup> Cu	0.59	1.07	0.39	32.5	0.49	0.66	0.39	15.9
<sup>66</sup> Zn	61.5	85.5	42.7	26.2	16.9	40.9	5.1	70.0
<sup>75</sup> As	0.85	1.7	0.28	60.4	1.2	2.1	0.56	42.1
<sup>82</sup> Se	0.79	1.4	0.42	37.0	1.5	2.3	0.58	35.1
<sup>85</sup> Rb	0.19	0.29	0.14	22.3	0.56	0.65	0.45	11.9
<sup>88</sup> Sr	584	725	459	13.6	0.61	1.0	0.16	40.4
<sup>105</sup> Pd	1.03	1.4	0.40	31.8	0.02	0.03	0.02	9.5
<sup>111</sup> Cd	0.05	0.08	0.03	37.7	0.01	0.02	0.008	35.7
<sup>137</sup> Ba	1.8	3.6	1.2	38.6	0.05	0.09	0.03	37.2
<sup>139</sup> La	0.14	0.25	0.003	54.9	0.008	0.024	0.003	78.7
<sup>201</sup> Hg	0.11	0.18	0.05	39.9	0.52	0.90	0.24	45.1
<sup>208</sup> Pb	0.18	0.65	0.03	104.1	0.02	0.03	0.01	20.7

#### 4.4.6.1. Discusión y análisis de los resultados

La FAO recomienda unos límites máximos de ciertos metales (Cd, Pb y Zn) en especies marinas<sup>178</sup>. De manera similar, la Agencia para la Protección del Medio Ambiente de Estados Unidos (EPA) establece límites para Pb, Cd, Hg, Ni, Zn, Cu y Cr en peces<sup>179</sup>. Además, la Comisión Europea ha adoptado una regulación<sup>180, 181</sup> que establece niveles máximos de Pb, Cd y Hg en varias especies de peces, entre la que se encuentran varios túnidos. Asimismo, la Comisión recomienda la restricción del consumo en niños,



embarazadas y madres en periodo de lactancia de diversas especies de peces, especialmente pez espada y atún, debido a los niveles de Hg que presentan<sup>182</sup>. En la Tabla 4.18 se muestran límites de metales en pescado establecidos por estos organismos.

Tabla 4.18. Límites de metales en pescado establecidos por la Regulación CE/629/2008, la FAO y la EPA (mg kg<sup>-1</sup>).

Elemento	CE/629/2008 y CE/1881/2006 (en carne de pescado, en peso fresco)	FAO (en pescado fresco)	EPA
Pb	0.3	0.5	4
Cd	0.1*	0.5	0.2
Hg	1.0*	-	0.5
Ni	-	-	1
Zn	-	30	-
Cu	-	30	120
Cr	-	-	8

\* Carne de pescado de atún (especies del género *Thunnus*)

En las muestras analizadas las concentraciones medias de los metales legislados en tejido muscular en ningún caso superaron los límites establecidos por la FAO, la EPA o la Comisión Europea. Las concentraciones más altas en tejido muscular fueron de 0.03 mg kg<sup>-1</sup> y 0.02 mg kg<sup>-1</sup> de Cd, y 0.04 mg kg<sup>-1</sup> y 0.03 mg kg<sup>-1</sup> de Pb en bonito y atún respectivamente. Sin embargo, cabe destacar que cuatro muestras de tejido muscular de bonito excedieron la concentración máxima permitida por la CE para Hg (1 mg kg<sup>-1</sup>) y dos más excedieron el límite establecido por la EPA (0.5 mg kg<sup>-1</sup>), siendo la concentración más alta encontrada de 1.4 mg kg<sup>-1</sup>. Además, cuatro muestras de tejido muscular de atún rojo superaron los límites establecidos por la EPA, siendo la máxima concentración encontrada de 0.9 mg kg<sup>-1</sup>.

Merece la pena señalar que los valores medios cuantificados de Mg, Mn, Fe, Co, Cu, Cd y As en tejido muscular coinciden con los encontrados por Hellou y cols.<sup>183</sup> en el año 1992, mientras que el Al (0.4 mg kg<sup>-1</sup> en el trabajo de Hellou y cols.), Zn (6 mg kg<sup>-1</sup>), y Se (0.8 mg kg<sup>-1</sup>) registraron valores más bajos que en el presente estudio, y el Hg (1.29 mg kg<sup>-1</sup>) mostró un valor claramente superior. Se debe tener en cuenta, en cualquier caso, que en el mencionado estudio sólo se analizó la especie *Thunnus thynnus*.

Como se recoge en las Tablas 4.16 y 4.17, la desviación estándar relativa de la concentración de cada metal entre muestras varió entre el 6.3 y el 130.9%. Esta variación fue más evidente en los elementos presentes en menor concentración. Para conocer si las diferencias existentes entre la concentración de los elementos analizados en ambas especies era significativa o no, se aplicó el test t de Student, del mismo modo que el descrito para la comparación de los resultados de las cuantificaciones por dilución isotópica. Los valores de las t calculadas ( $t_{cal}$ ) y las t tabuladas ( $t_{critica}$ ) se muestran en la Tabla 4.19. En cuanto a la comparación de las concentraciones medias de metales en bonito y atún rojo en tejido muscular, exceptuando el Ba, no hubo diferencias significativas, lo que era de esperar para elementos cuya presencia en el organismo depende de la fisiología del pez. Sin embargo, en lo que respecta a las muestras de espina, el test t de Student mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para V, Cr, Mn, Co, Cu, Se, Sr y La entre las dos especies de túnidos analizadas. Esto podría explicarse en base a los diferentes hábitats y hábitos migratorios del bonito y el atún rojo, lo que sugiere que la concentración de V, Cr, Mn, Co, Cu, Se, Sr y La en la espina está más influenciada por las características del ambiente. Sin embargo, de acuerdo a estudios previos<sup>130</sup> las diferencias en las concentraciones de Sr en peces marinos se deben no sólo a la química del agua, sino también a otros factores como los procesos fisiológicos o la alimentación.

Tabla 4.19. Valores de  $t_{cal}$  y  $t_{critica}$  para el test t de las concentraciones elementales en bonito y en atún rojo.

Analito	Espina dorsal		Tejido muscular	
	$t_{cal}$	$t_{critica}$	$t_{cal}$	$t_{critica}$
<sup>11</sup> B	1.85	2.14	0.54	2.14
<sup>25</sup> Mg	0.69	2.04	1.14	2.04
<sup>27</sup> Al	1.63	2.14	0.42	2.04
<sup>51</sup> V	2.91	2.04	1.16	2.04
<sup>52</sup> Cr	3.08	2.04	0.47	2.18
<sup>55</sup> Mn	3.47	2.04	1.29	2.04
<sup>56</sup> Fe	-	2.04	1.05	2.04
<sup>59</sup> Co	2.51	2.04	0.63	2.04
<sup>60</sup> Ni	-	2.04	0.60	2.04
<sup>63</sup> Cu	2.83	2.04	0.84	2.04
<sup>66</sup> Zn	1.29	2.04	0.35	2.04
<sup>75</sup> As	0.30	2.18	1.18	2.04
<sup>82</sup> Se	2.46	2.12	1.77	2.12
<sup>285</sup> Rb	0.75	2.04	0.70	2.04
<sup>88</sup> Sr	2.99	2.04	0.11	2.04
<sup>105</sup> Pd	1.87	2.04	2.00	2.04
<sup>111</sup> Cd	1.03	2.04	0.88	2.04
<sup>137</sup> Ba	0.63	2.04	2.43	2.04
<sup>139</sup> La	4.90	2.04	1.44	2.12
<sup>201</sup> Hg	0.42	2.04	0.40	2.04
<sup>208</sup> Pb	1.19	2.04	0.35	2.04

Puesto que las concentraciones en espina dorsal y tejido muscular de un mismo individuo no son necesariamente observaciones independientes, se empleó el test t por parejas para estudiar las diferencias entre las concentraciones de espina y tejido muscular. En este caso, el valor de t se calcula según la siguiente expresión:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{d}|}{s_d / \sqrt{n}}$$

Ecuación 4.16

Donde  $|\bar{d}|$  es la media aritmética de las diferencias individuales entre la concentración de un elemento en la espina dorsal y en el tejido muscular, y  $s_d$  su desviación estándar.

Como se observa en la Tabla 4.20, el test t por parejas mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para todos los analitos, siendo la bioacumulación en espinas mayor que en

tejido muscular. Las concentraciones observadas de Sr y Mg en espina fueron considerablemente superiores a las correspondientes en tejido muscular. La razón puede ser que el HAp ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), componente mayoritario de las espinas, tiene un carácter iónico que le confiere a la molécula la habilidad de sustituir iones de Ca de su red por otros iones divalentes del Grupo II de similar tamaño (como  $\text{Sr}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ ). Además, es destacable que las concentraciones de As, Se, Rb y Hg en tejido muscular fueron más elevadas que en espina, tal y como han observado previamente otros autores para Hg y Se en escamas<sup>113</sup>.

Tabla 4.20. Valores de  $t_{cal}$  de test t por parejas para las concentraciones elementales en la primera espina dorsal y en tejido muscular ( $t_{critico} = 2.04$ ).

Analito	$t_{cal}$	Analito	$t_{cal}$
<sup>11</sup> B	14.29	<sup>82</sup> Se	10.96
<sup>25</sup> Mg	25.13	<sup>85</sup> Rb	29.29
<sup>27</sup> Al	4.83	<sup>88</sup> Sr	40.19
<sup>51</sup> V	17.22	<sup>105</sup> Pd	24.04
<sup>52</sup> Cr	5.68	<sup>111</sup> Cd	11.35
<sup>55</sup> Mn	18.32	<sup>137</sup> Ba	12.13
<sup>59</sup> Co	21.34	<sup>139</sup> La	4.77
<sup>63</sup> Cu	3.68	<sup>201</sup> Hg	8.59
<sup>66</sup> Zn	14.34	<sup>208</sup> Pb	7.81
<sup>75</sup> As	3.55		

Con el objetivo de investigar posibles asociaciones entre las concentraciones en tejido muscular y en la primera espina dorsal, se llevó a cabo un análisis de correlación para cada metal en ambas matrices. Tras verificar la distribución normal de los resultados, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson, que mide la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. Este coeficiente puede adquirir valores entre -1 y 1. En el primer caso la relación lineal sería claramente negativa, en el segundo ésta resultaría positiva, y valores próximos a cero indicarían una relación no lineal. Para conocer la significación de dicho coeficiente se calculó el valor de la t de Student para N-2 grados de libertad, cuyo valor debe ser superior al valor de t crítico para un cierto nivel de significación p y N-2 grados de libertad en los casos en los que las variables están relacionadas linealmente. Los resultados se recogen en la Tabla 4.21.

Tabla 4.21. Coeficiente de correlación de Pearson (R) y valor de la t de Student calculado ( $t_{cal}$ ) entre las variables concentración en espina y concentración en tejido muscular en las muestras de bonito (Nº de muestras= 22) y atún rojo (Nº de muestras= 12).

Analito	Bonito ( <i>Thunnus alalunga</i> )		Atún rojo ( <i>Thunnus thuyinus</i> )	
	R	$t_{cal}^{*, a}$	R	$t_{cal}^{*, b}$
<sup>11</sup> B	0.14	0.74	0.23	1.23
<sup>25</sup> Mg	-0.18	0.99	-0.17	0.91
<sup>27</sup> Al	-0.07	0.37	0.06	0.33
<sup>51</sup> V	0.25	1.37	0.27	1.51
<sup>52</sup> Cr	-0.12	0.66	-0.37	2.08
<sup>55</sup> Mn	0.10	0.56	0.02	0.10
<sup>59</sup> Co	-0.21	1.14	0.16	0.85
<sup>63</sup> Cu	-0.20	1.10	0.17	0.91
<sup>66</sup> Zn	0.46	2.76	0.10	0.56
<sup>75</sup> As	0.31	1.73	0.36	2.02
<sup>82</sup> Se	-0.19	1.01	0.55	3.44
<sup>85</sup> Rb	0.33	1.83	0.37	2.13
<sup>88</sup> Sr	0.19	1.01	-0.04	0.22
<sup>105</sup> Pd	0.22	1.19	0.12	0.66
<sup>111</sup> Cd	0.42	2.48	0.30	1.65
<sup>137</sup> Ba	0.28	1.54	0.12	0.65
<sup>139</sup> La	0.14	0.75	0.11	0.58
<sup>201</sup> Hg	0.88	9.92	0.89	10.3
<sup>208</sup> Pb	-0.01	0.04	-0.02	0.13

\* Los valores de la t de Student críticos para los distintos niveles de significación (p) son:

- a) 1.72 (p<0.1), 2.09 (p<0.05) y 2.53 (p<0.01) (n=22).
- b) 1.81 (p<0.1), 2.23 (p<0.05) y 2.76 (p<0.01) (n=12).

Los resultados presentados en la Tabla 4.21 muestran una correlación positiva entre la concentración en la primera espina dorsal y en el tejido muscular para el As, Rb, Cd y Hg en ambas especies. Además, el Zn mostró una correlación lineal positiva en bonito, mientras que el Se lo hizo en atún rojo. Esta correlación positiva indica que hay también acumulación de estos metales en tejido muscular. Esta afirmación está en consonancia con la mayor concentración de As, Se, Rb y Hg observada en tejido muscular en comparación con las concentraciones en espina. Las Figuras 4.12 y 4.13 muestran los diagramas de dispersión de los elementos que presentan correlaciones positivas para ambas especies, los cuales permiten entender la relación entre las dos variables.

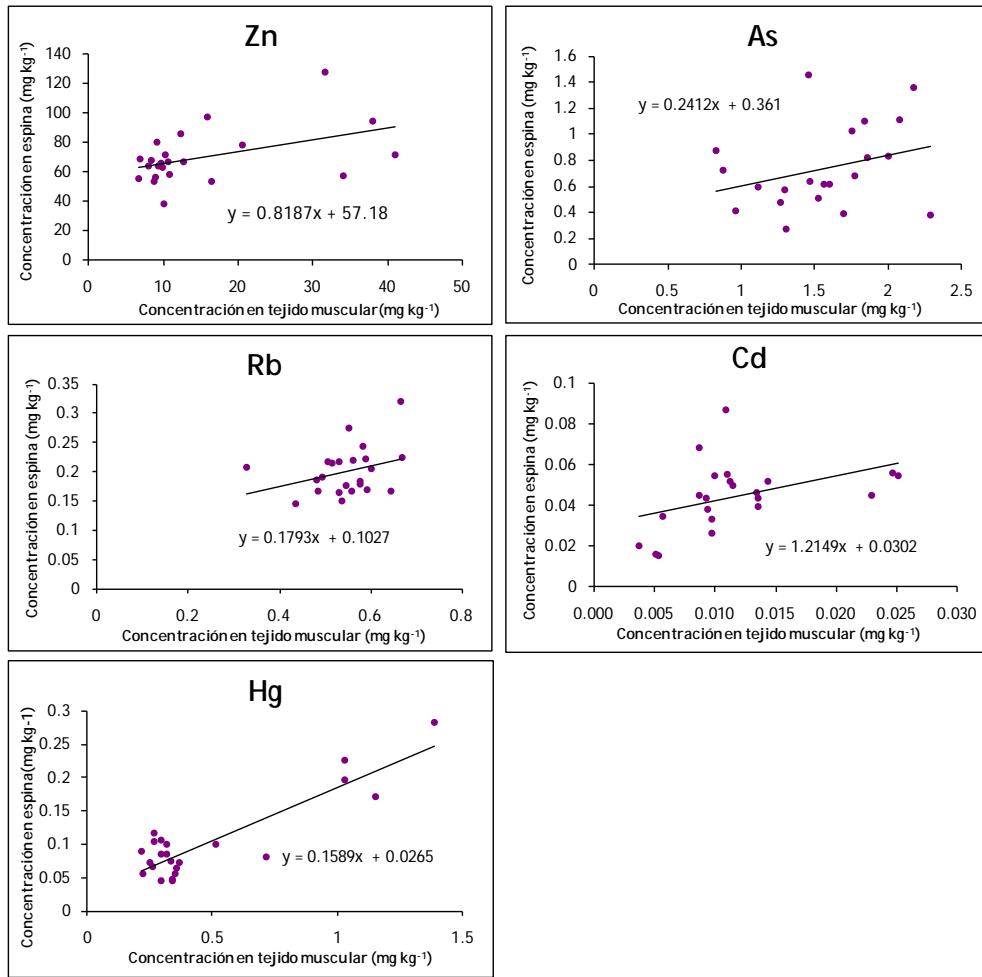


Figura 4.12. Diagramas de dispersión para Zn, As, Rb, Cd y Hg en tejido muscular y espina dorsal de bonito.

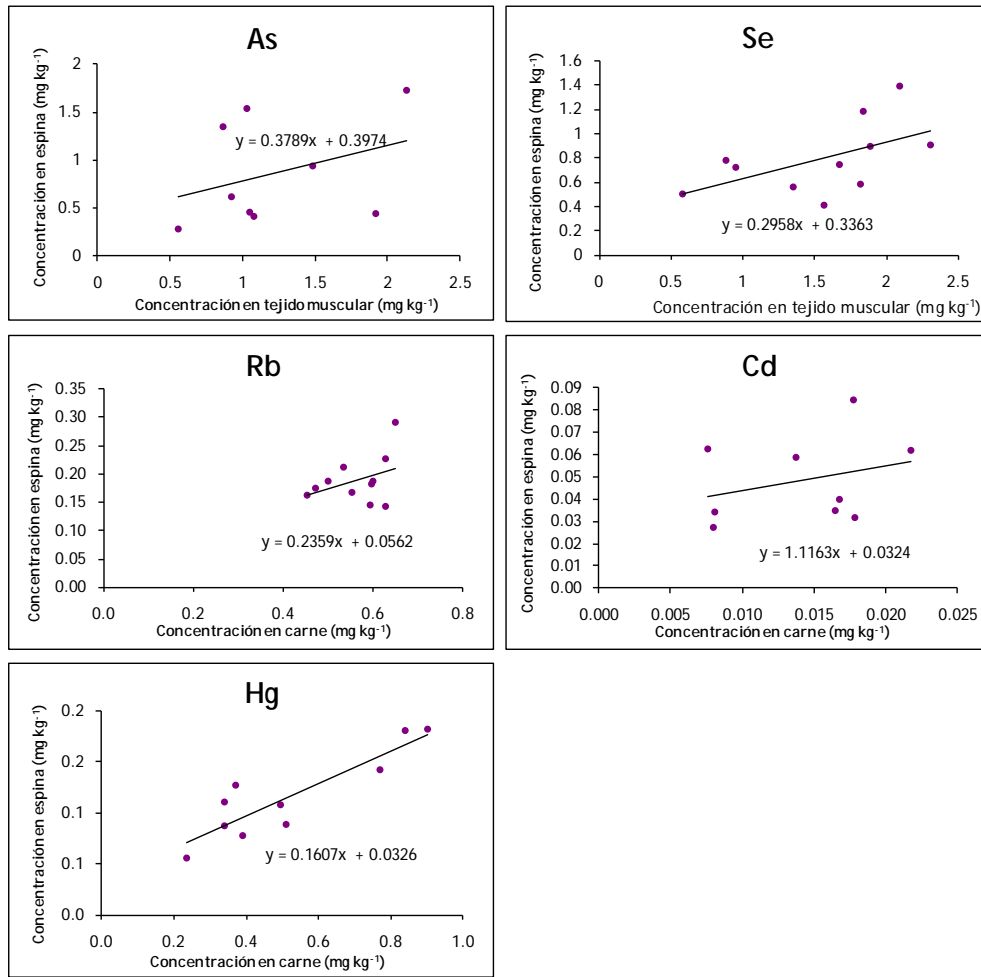


Figura 4.13. Diagramas de dispersión para As, Se, Rb, Cd y Hg en tejido muscular y espina dorsal de atún rojo.

En otros casos, como el ya mencionado del Mg y Sr, la influencia de la matriz de HAP era tan evidente, que la concentración de la espina no podría utilizarse para la estimación de la concentración en tejido muscular. Para el resto de metales no puede establecerse una correlación lineal y se puede concluir que ambas variables son independientes entre sí. Esto puede deberse a diferentes causas, entre las que se incluyen el estrecho rango de concentración y la ausencia de relaciones cuantitativas estrictas. Para comprobar esta última posibilidad, se calcularon las relaciones entre la concentración en espina dorsal y en tejido muscular y se compararon estos valores con la concentración en el tejido muscular (Figuras 4.14 y 4.15). Una relación espina/tejido

muscular constante independiente de la concentración en tejido muscular indica una correlación entre ambas matrices. Mediante estas representaciones no se mostraron relaciones constantes para los elementos para los cuales no se había observado previamente una correlación mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Cabe destacar que para el As, Rb y Cd, los valores de las relaciones espina/tejido muscular fueron más homogéneos, lo que respalda la correlación lineal positiva entre los contenidos en espina y tejido muscular para estos elementos. Sin embargo, para el Zn, Se y Hg las relaciones espina/tejido muscular fueron mayores a menor concentración en tejido muscular, lo que indica que la acumulación de estos elementos en espinas ocurre en mayor medida a bajos niveles de concentración en tejido muscular y que la correlación lineal sólo se puede afirmar a las concentraciones más altas.

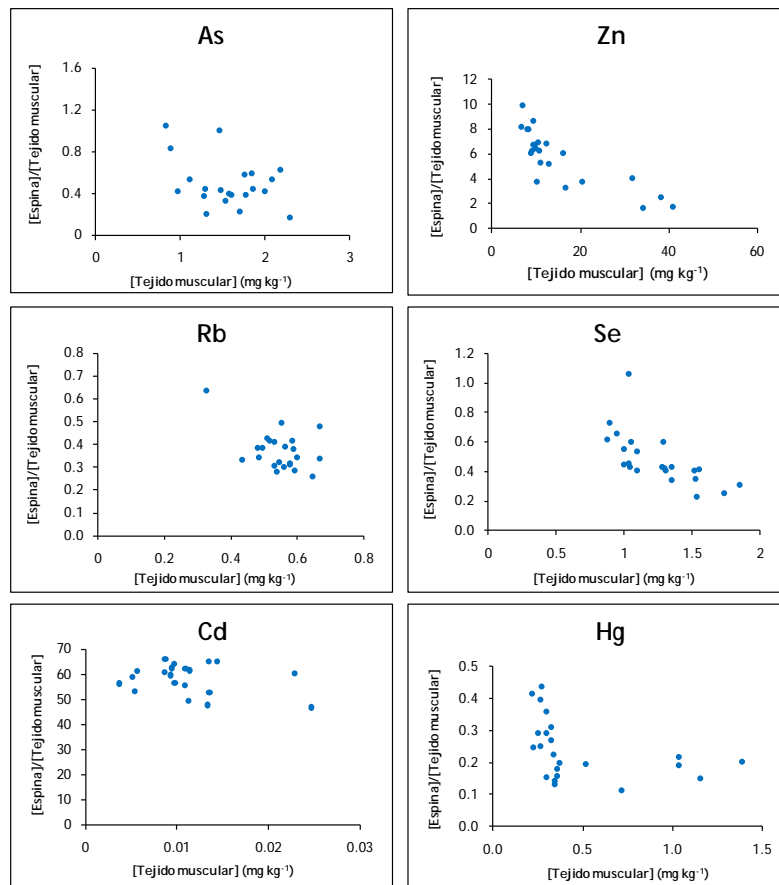


Figura 4.14. Representación de la relación concentración espina dorsal/ concentración tejido muscular vs. la concentración en tejido muscular para As, Zn, Rb, Se, Cd y Hg en bonito.



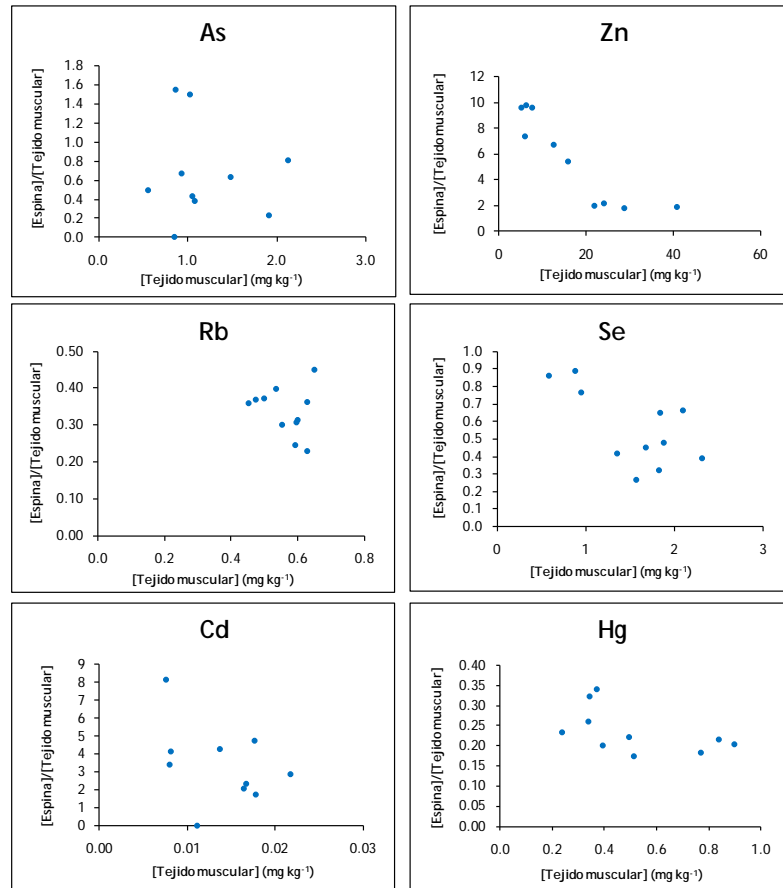


Figura 4.15. Representación de la relación concentración espina dorsal/ concentración tejido muscular vs. la concentración en tejido muscular para As, Zn, Rb, Se, Cd y Hg en atún rojo.

## 4.5. Desarrollo de una metodología por LA-ICP-MS para la cuantificación *matrix-matching* de elementos traza en la espina dorsal de túnidos

En esta sección se describe el procedimiento ideado para la síntesis de patrones sólidos de hidroxiapatito (HAp) por co-precipitación con 12 analitos de interés para cuantificar por medio de LA-ICP-MS elementos traza en la espina dorsal de bonito y atún rojo. Asimismo, se han analizado las características de estos patrones y se ha evaluado analíticamente el método desarrollado. Del mismo modo, se recoge la comparación entre la calibración *matrix-matching* y la *non matrix-matching*. Por último, se trata la aplicación de la metodología a las muestras reales, destacando algunos de los resultados.

### 4.5.1. Preparación de las espinas dorsales para su análisis por LA-ICP-MS

Para llevar a cabo los análisis de las espinas dorsales de bonito y atún rojo por LA-ICP-MS se realizó un corte transversal a la altura de la base del cóndilo (Figura 4.16a) de aproximadamente 1.3 mm de grosor con una sierra de rotación lenta Isomet lubricada con agua Milli-Q a una velocidad de 300 rpm.

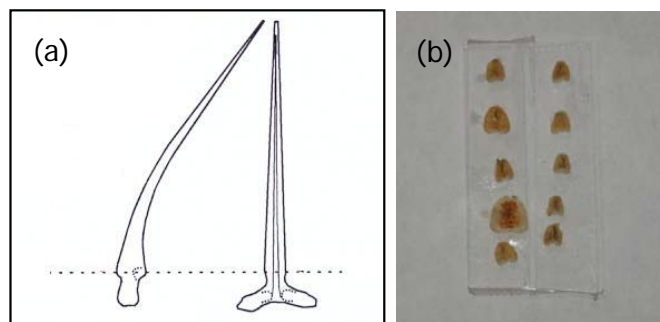


Figura 4.16. Preparación de las espinas dorsales para LA-ICP-MS: (a) Zona de corte; (b) Cortes transversales colocados sobre un portaobjetos preparados para el análisis.

Las secciones se montaron sobre portaobjetos con cinta adhesiva de doble cara (Figura 4.16b), que se guardaron a temperatura ambiente en botes de 50 mL de polipropileno hasta su análisis. La parte restante de la espina se congeló en papel de filtro a  $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.5.2. Parámetros LA-ICP-MS

Para el trabajo con LA-ICP-MS se decidió utilizar condiciones de plasma húmedo. El término “húmedo” hace referencia a un plasma en el que está presente el agua, es decir, el clásico plasma que se produce en los análisis en disolución. El plasma húmedo produce condiciones más estandarizadas, con el agua como una única especie dominante en el plasma<sup>184</sup>. De este modo, el agua domina la carga del plasma y sólo se producen pequeñas perturbaciones debidas a la matriz de la muestra, lo que conlleva una reducción del efecto de matriz. A pesar de presentar el inconveniente de mayores interferencias espectrales derivadas de la presencia de óxidos e hidróxidos, dada la robustez del plasma húmedo, el trabajo en estas condiciones resulta, con todo, beneficioso para LA-ICP-MS. Boulyga y cols.<sup>185</sup> comprobaron que las relaciones  $^{65}\text{Cu}/^{66}\text{Zn}$  obtenidas por LA-ICP-MS en condiciones de plasma húmedo se encontraban más próximas a las relaciones obtenidas tras la digestión y análisis en disolución tradicional de las muestras, que utilizando condiciones de plasma seco. Estas diferencias pueden atribuirse al fraccionamiento en el ICP en condiciones de plasma seco frente al plasma húmedo, debido a condiciones de atomización e ionización diferentes<sup>184</sup>.

Para poder trabajar en condiciones de plasma húmedo, se utilizó un conector en Y que fue específicamente diseñado en nuestro laboratorio y fabricado para cumplir los requerimientos físicos del ICP-MS Agilent 7500ce utilizado en el presente trabajo (Figura 4.17).

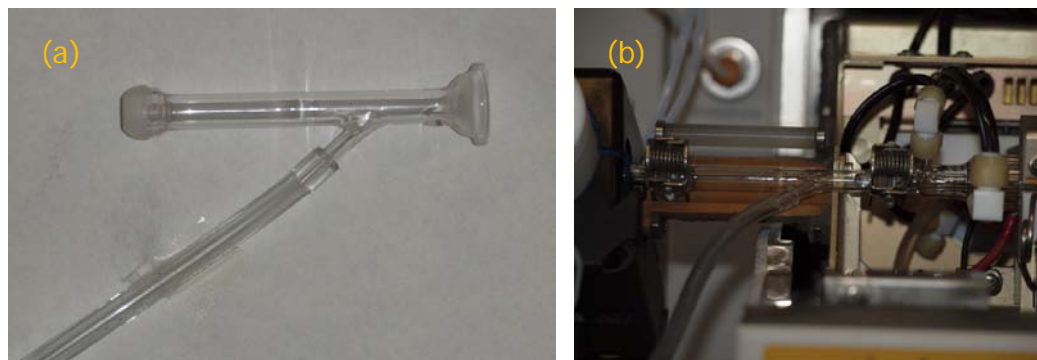


Figura. 4.17. Conector en Y diseñado para el sistema de introducción de muestras dual: (a) Detalle del conector; (b) Conector colocado en el ICP-MS.

Este sistema de introducción de muestras dual permitió realizar los análisis por LA-ICP-MS nebulizando mediante auto-aspiración una disolución de Tl de  $1 \text{ ng g}^{-1}$  al mismo tiempo, lo cual permitía monitorizar la estabilidad del plasma a lo largo de los análisis. Asimismo, el conector en Y ideado facilitó la optimización diaria de las condiciones de trabajo. Gracias al sistema de introducción de muestras dual, en primer lugar se llevó a cabo el ajuste habitual de las condiciones del ICP-MS aspirando la disolución de optimización (*tuning solution*) de  $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de Li, Mg, Co, Y, Ce y Tl. Tras esta optimización preliminar, sin tener que hacer ningún cambio en el sistema, es decir, sin necesidad de apagar el plasma para conectar la salida de la celda de ablación al ICP, se optimizaron las condiciones de la ablación láser. Para ello, se realizó una ablación en línea sobre el vidrio NIST 612 mientras se auto-aspiraba la disolución de Tl de  $1 \text{ ng g}^{-1}$  y se ajustaron los parámetros del ICP-MS para aumentar la sensibilidad y reducir la formación de óxidos e iones doblemente cargados. Además, en esta etapa las condiciones de operación del ICP-MS se optimizaron específicamente para eliminar efectos de fraccionamiento. Para ello se compararon las intensidades de U y Th. Ambos elementos se encuentran presentes en el NIST 612 al mismo nivel de concentración, tienen potenciales de ionización y masa similares y su isótopo mayoritario tiene una

abundancia superior al 99%. En consecuencia, si se consigue una atomización completa, el ratio de sus intensidades debe ser próximo a la unidad.

Se decidió trabajar con He como gas portador por sus mejores características de ablación y transporte<sup>65, 66, 68</sup> previamente comentadas. Debido a que el sistema de LA utilizado no cuenta con un controlador de flujo másico propio para la introducción del gas portador, habitualmente se trabaja utilizando el Ar de nebulización del ICP-MS como gas portador de LA. Con el objetivo de poder emplear He, se realizaron algunos cambios en la configuración estándar del ICP-MS. Así, se colocaron una serie de racores en "T" y válvulas de bola de Swagelok® que permitieron utilizar el controlador de flujo másico del gas opcional (convencionalmente utilizado para una mezcla de oxígeno y argón en aplicaciones en las que se introducen disolventes orgánicos al plasma) para introducir He como gas portador en ablación láser. En la Figura 4.18 se muestra una fotografía del sistema de válvulas diseñado y el correspondiente diagrama de flujos de gas.

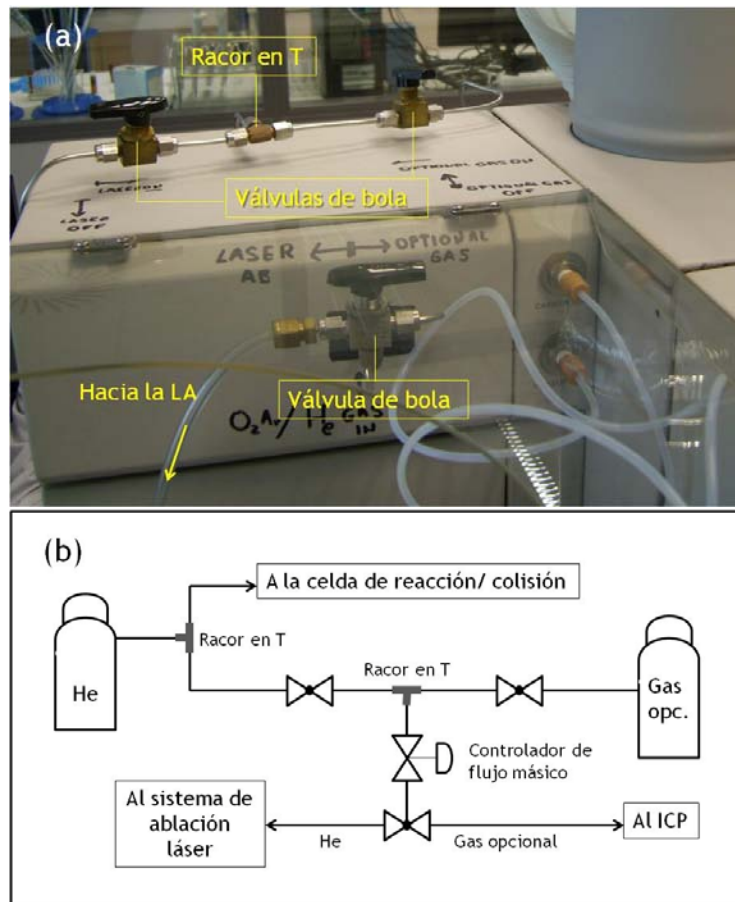


Figura 4.18. Sistema de llaves que permiten utilizar el controlador de flujo másico propio del gas opcional para introducir He como gas portador en la ablación láser: (a) Imagen; (b) Diagrama de flujos de gas.

Los flujos del gas portador de la celda de ablación (He) y del Ar nebulizador se optimizaron ensayando flujos de He entre 0.4 y 0.6 L min<sup>-1</sup>, y flujos de Ar entre 0.5 y 1 L min<sup>-1</sup> mientras se ablacionaba el vidrio NIST 612. A flujos de Ar menores de 0.6 L min<sup>-1</sup> la sensibilidad era muy baja, mientras que a flujos iguales o superiores a 0.9 L min<sup>-1</sup> aumentaba el fraccionamiento, con relaciones Th/U inferiores al 76%. La variación del flujo de He tenía una influencia menos marcada en el fraccionamiento, mientras que la sensibilidad disminuía ligeramente a flujos del mismo por encima de 0.48 L min<sup>-1</sup>. Las mejores condiciones, con sensibilidad alta y fraccionamiento bajo (Th/U de en torno al 92 %) se obtuvieron con 0.75 L min<sup>-1</sup> de Ar y 0.44 L min<sup>-1</sup> de He.

En lo que a la selecci3n de las condiciones de operaci3n del l3ser para la realizaci3n de los an3lisis se refiere, en primer lugar se decidi3 el modo de ablaci3n. Puesto que los anillos de las espinas dorsales presentan una distribuci3n conc3ntrica (tal y como se ha visto en el apartado 4.1.3), se opt3 por hacer l3neas de ablaci3n en continuo (*scan ablation*) desde el centro de la espina hasta el borde, de tal manera que se recogiera informaci3n sobre la concentraci3n elemental a lo largo de toda la l3nea, lo cual se adapta al objetivo de este estudio. El l3ser se focaliz3 en la superficie de la muestra. Con el objetivo de eliminar posible contaminaci3n superficial de las muestras y patrones, antes de llevar a cabo la ablaci3n para los an3lisis, se realiz3 una pre-ablaci3n a mayor velocidad de *scan* y menor energ3a, lo cual constituye una pr3ctica habitual en este tipo de an3lisis. Durante las ablaciones propiamente dichas, el l3ser se desplaz3 a una velocidad de  $5 \mu\text{m s}^{-1}$ , de modo que se obtuvo una buena resoluci3n espacial sin comprometer el tiempo de an3lisis. Los patrones de calibraci3n de HAp, el vidrio NIST 612 y el SRM 1486 de harina de hueso pelletizado se ablacionaron en las mismas condiciones que las muestras de espina, con la 3nica diferencia que en 3stos se ablacionaron l3neas de  $500 \mu\text{m}$  en todos los casos y en las muestras la longitud de la l3nea de ablaci3n se ajust3 al tama3o de cada una de ellas. La medida de la se3al del He fue sistem3ticamente adquirida durante 15 s antes de cada an3lisis.

En cuanto a las condiciones de detecci3n referentes al ICP-MS, se adquirieron las se3ales de 19 is3topos correspondientes a 12 analitos (Mg, Al, V, Mn, Zn, As, Sr, Rb, Cd, Ba, Hg y Pb), el Tl y el Ca. De entre los 21 analitos previamente estudiados, se seleccionaron estos por su importancia ambiental. Adem3s, la monitorizaci3n de muchos is3topos implicar3a el sacrificio de la resoluci3n espacial o la precisi3n (si se optara por disminuir el tiempo de integraci3n para no perder resoluci3n espacial). La intensidad de los is3topos de inter3s fue sistem3ticamente normalizada frente a la se3al del  $^{43}\text{Ca}$  tras restarle la se3al media del ruido. Tal y como se ha visto en el apartado "Estrategias de calibraci3n en LA-ICP-MS", la normalizaci3n es esencial en la t3cnica LA-ICP-MS para compensar variaciones en la tasa de ablaci3n debidas a derivas en la energ3a del l3ser o cambios en la densidad de muestra. Se seleccion3 Ca como elemento para la normalizaci3n porque se distribuye homog3neamente en la matriz de HAp de

las espinas, en los patrones de HAp, en el SRM 1486 y en el NIST 612 (cuya matriz está constituida por óxido de Ca en un 12%). La concentración de Ca en los patrones de HAp, en el SRM 1486, en el NIST 612 así como en las espinas de cada individuo es diferente y por consiguiente, fue necesario determinarla y tenerlo en cuenta en la normalización. La cuantificación de Ca en las espinas se realizó mediante ICP-MS, de modo análogo al descrito anteriormente.

Las condiciones de ablación y detección se recogen en la Tabla 4.22.

Tabla 4.22. Condiciones de operación de LA-ICP-MS.

Ablación láser	Longitud de onda	266 nm	
	Duración de pulso	4 ns	
	Frecuencia	20 Hz	
	Diámetro del haz	120 $\mu\text{m}$	
	Flujo de gas portador (He)	0.44 L $\text{min}^{-1}$	
		<u>Pre-ablación</u>	<u>Ablación</u>
	Velocidad de <i>scan</i>	50 $\mu\text{m s}^{-1}$	5 $\mu\text{m s}^{-1}$
	Energía	40 %	60 %
Fluencia	$\sim 2 \text{ J cm}^{-2}$	8.2-9.6 $\text{J cm}^{-2}$	
ICP-MS	Potencia de radio frecuencia	1500 W	
	Flujo de gas plasmógeno	15 L $\text{min}^{-1}$	
	Flujo de gas nebulizador	0.75 L $\text{min}^{-1}$	
	Flujo de gas auxiliar	1.0 L $\text{min}^{-1}$	
	Flujo de gas adicional ( <i>Make-up</i> )	0.15 L $\text{min}^{-1}$	
	Tipo de Nebulizador	Microconcéntrico: MicroMist	
	Cámara de nebulización	De doble paso de tipo Scott refrigerada a 2 °C	
	Antorcha	Tipo Fassel (Diámetro interno 2.5 mm)	
	Conos	Ni	
	Posición en profundidad de la antorcha ( <i>Sampling depth</i> )	6.5 mm	
	Tiempo de integración por masa	25 ms	
	Isótopos monitorizados	$^{24}\text{Mg}$ , $^{26}\text{Mg}$ , $^{27}\text{Al}$ , $^{43}\text{Ca}$ , $^{51}\text{V}$ , $^{55}\text{Mn}$ , $^{66}\text{Zn}$ , $^{68}\text{Zn}$ , $^{75}\text{As}$ , $^{84}\text{Sr}$ , $^{85}\text{Rb}$ , $^{86}\text{Sr}$ , $^{111}\text{Cd}$ , $^{114}\text{Cd}$ , $^{135}\text{Ba}$ , $^{138}\text{Ba}$ , $^{205}\text{Tl}$ , $^{202}\text{Hg}$ , $^{208}\text{Pb}$	
	Modo de adquisición	Time Resolved Analysis (TRA)	



Con las condiciones de operación de LA-ICP-MS descritas se realizaron 5 ablaciones en el vidrio NIST 612. La reproducibilidad de las señales de los analitos en las medidas se recoge en la Tabla 4.23. Como se observa, para la mayoría de los elementos se obtuvieron valores de RSD inferiores al 10%, lo que indica la buena reproducibilidad del acoplamiento LA-ICP-MS. El alto valor de RSD obtenido para el Hg (20.4%) podría deberse a la comparativamente baja señal de este analito en el NIST 612.

Tabla 4.23. Reproducibilidad de las señales de los analitos en el vidrio NIST 612. Condiciones de experimentales de LA-ICP-MS según Tabla 4.22.

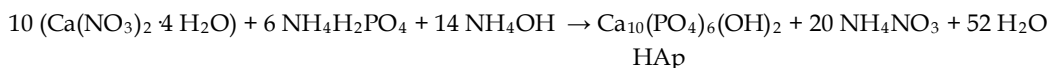
Analito	RSD (%)	Analito	RSD (%)
<sup>24</sup> Mg	6.7	<sup>85</sup> Rb	6.2
<sup>27</sup> Al	5.6	<sup>86</sup> Sr	8.0
<sup>51</sup> V	4.8	<sup>111</sup> Cd	8.1
<sup>55</sup> Mn	2.9	<sup>138</sup> Ba	8.9
<sup>66</sup> Zn	6.2	<sup>202</sup> Hg	20
<sup>75</sup> As	8.0	<sup>208</sup> Pb	9.5

### 4.5.3. Preparación de los patrones de calibración de HAp enriquecidos

#### 4.5.3.1. Selección de la ruta de síntesis del HAp

Como ya se ha comentado anteriormente, la espina está compuesta principalmente por el biomineral HAp. Para la preparación en el laboratorio de los estándares de calibración de HAp, en primer lugar se ensayaron dos posibles rutas de síntesis del mismo:

1. Precipitación de HAp a partir de nitrato de calcio tetrahidratado y amonio dihidrógeno fosfato a pH 10, según la reacción:



Brevemente, a una disolución 0.48 M de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , cuyo pH se ajustó previamente con  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10, se añadió gota a gota una disolución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4$

H<sub>2</sub>O (1 M) cuyo pH también se ajustó de igual modo a 10. La mezcla se sometió a agitación durante tres horas y se dejó reposar a temperatura ambiente durante cinco días. Luego, se recuperó el precipitado, se lavó con agua destilada y se dejó secar a temperatura ambiente. Después del secado, el precipitado se sometió a 450 °C durante tres horas para favorecer la cristalización.

2. Disolución con HNO<sub>3</sub> de un HAp comercial y posterior re-precipitación con NH<sub>4</sub>OH. La disolución del polvo de HAp comercial se realizó en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos a 40 °C.

Una vez obtenidos los correspondientes precipitados, ambos fueron analizados por difracción de rayos X (XRD). Sin embargo, tal y como se observa en los diagramas correspondientes en la Figura 4.19, únicamente mediante la primera ruta de síntesis se obtuvo una fase cristalina correspondiente al HAp. Por consiguiente, se optó por preparar los patrones sólidos de HAp enriquecidos con los analitos objeto de estudio mediante la primera estrategia descrita.

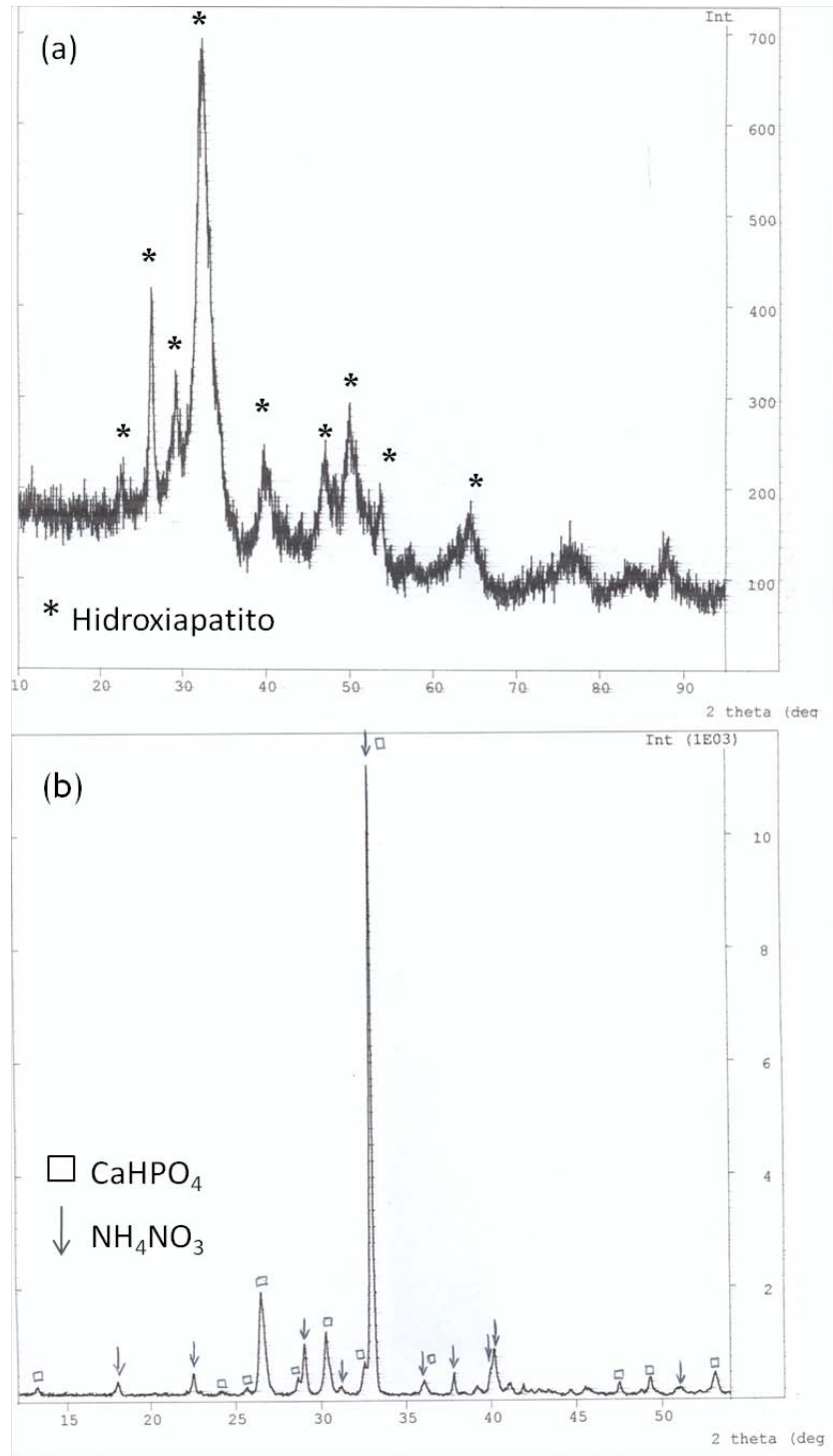


Figura 4.19. Diagramas de difracción de rayos X de los precipitados obtenidos mediante las dos rutas de síntesis ensayadas: (a) Ruta 1; (b) Ruta 2.

#### 4.5.3.2. Estudio preliminar de recuperaciones de los analitos

Una vez seleccionada la ruta de síntesis química por precipitación del HAp, se prepararon cuatro precipitados de HAp, un blanco y tres dopados con los metales de interés a tres niveles de concentración. Estos HAp-s se sintetizaron con el objetivo de conocer los porcentajes de recuperación de los analitos en el proceso de síntesis, para la posterior preparación de los patrones de HAp finales.

Con ese fin, se prepararon 3 disoluciones multielemento con concentraciones crecientes de los metales, disoluciones que fueron añadidas a la disolución acuosa de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  antes de la adición del  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ , de tal manera que los metales co-precipitaran con el HAp. Tras comprobar mediante difracción de rayos X que la fase cristalina del precipitado obtenido se correspondía con el HAp y que por tanto la adición de las disoluciones de metales no alteraba el proceso de precipitación, se cuantificaron los metales en los HAp preparados. Para ello, una alícuota de cada uno de los HAp fue sometida a una digestión ácida (con ácido nítrico al 65 % en un baño de ultrasonidos durante 30 min a 40 °C) y los metales cuantificados por ICP-MS con el Elan DRC-II mediante el método de adiciones estándar.

En la Tabla 4.24 se recogen los porcentajes de recuperación de los analitos, es decir, el porcentaje de la cantidad añadida que se incorpora al HAp en el proceso de precipitación.

Tabla 4.24. Porcentajes de recuperación en el estudio preliminar de los analitos añadidos en los tres niveles de calibración de HAp.

Analito	HAp Nivel 1		HAp Nivel 2		HAp Nivel 3	
	Conc. teórica ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Recuperación (%)	Conc. teórica ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Recuperación (%)	Conc. teórica ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Recuperación (%)
$^{24}\text{Mg}$	997	69	3029	35	6048	30
$^{27}\text{Al}$	1.49	138	5.0	123	14.1	110
$^{51}\text{V}$	0.09	84	0.30	89	0.83	88
$^{55}\text{Mn}$	3.0	96	10.1	93	23.5	92
$^{66}\text{Zn}$	10.0	82	40.4	81	142	64
$^{75}\text{As}$	0.49	91	2.01	89	7.5	88
$^{85}\text{Rb}$	0.10	0.8	0.37	2.4	0.77	2.8
$^{86}\text{Sr}$	205	65	510	42	1021	36
$^{111}\text{Cd}$	0.01	71	0.03	94	0.09	72
$^{138}\text{Ba}$	1.00	33	3.0	36	6.5	32
$^{202}\text{Hg}$	0.02	8.3	0.08	9.2	0.23	7.4
$^{208}\text{Pb}$	0.05	60	0.14	82	0.36	86

Como se observa, para algunos de los analitos las recuperaciones fueron muy pobres, lo cual se consideró en la preparación final de los patrones de HAp. Las bajas recuperaciones pueden deberse a los elevados productos de solubilidad ( $K_s$ ), procesos de complejación o a la forma química de los elementos precipitados.

#### 4.5.3.2. Preparación de los patrones de calibración de HAp enriquecidos

Teniendo en cuenta las recuperaciones de los analitos en los patrones de HAp sintetizados en el estudio preliminar, se prepararon a partir de reactivos con muy baja concentración de metales (Suprapur) y en una sala blanca ISO clase 7, los patrones de HAp definitivos: un HAp blanco (al que no se le añadieron los analitos) y tres dopados a tres niveles de calibración (niveles crecientes de los 12 analitos). La concentración de cada analito en cada uno de los niveles de calibración fue ajustada de acuerdo con las concentraciones medias halladas en los análisis previos de las muestras de espina dorsal con el fin de garantizar una adecuada calibración externa por LA-ICP-MS de las mismas.

El procedimiento de síntesis detallado se recoge a continuación:

1. Se prepararon 25 mL de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1 M en agua, ajustando el pH de la disolución a 10 adicionando  $\text{NH}_4\text{OH}$ .
2. Se prepararon por otro lado 25 mL de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.48 M en agua, ajustando el pH de la disolución a 10 adicionando  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Para la obtención de los patrones de HAp enriquecidos esta disolución fue dopada con una disolución multielemento. Se prepararon tres disoluciones multielemento a partir de disoluciones stock de los analitos de  $1000 \mu\text{g g}^{-1}$  para todos los analitos a excepción del Mg, que fue preparado de un patrón sólido de alta pureza ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$ , 99.999%) debido a su elevada concentración en las muestras.
3. La disolución de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  fue añadida gota a gota y en condiciones de agitación magnética a la disolución de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ .
4. La mezcla fue agitada en un agitador orbital durante 3 horas.
5. Se dejó en reposo durante 5 días.
6. El precipitado fue filtrado y lavado con agua Milli-Q (Figura 4.20a).
7. Se dejó secar a temperatura ambiente y después se sometió a tratamiento térmico a  $450 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 3 horas en un generador de corriente a 10 A de intensidad y 10 V de potencial eléctrico (Figura 4.20b).
8. Tras una homogeneización manual con un mortero de ágata durante aproximadamente 10 min, 0.020 g de cada precipitado fueron finalmente comprimidos en una prensa hidráulica en *pellets* de 3 mm de diámetro bajo presión de 0.5 ton durante 2 min.



Figura 4.20. Procedimiento de síntesis de HAp: (a) Filtración del precipitado; (b) Tratamiento térmico.

Una vez sintetizados los patrones definitivos de calibración de HAp enriquecidos, se procedió a comparar las concentraciones teóricas y efectivas tras el proceso de coprecipitación para cada analito de interés, de tal manera que se pudieran corregir posibles contaminaciones o pérdidas.

Para ello, se digirieron tres alícuotas de cada patrón de HAp por digestión asistida por microondas siguiendo el mismo procedimiento que el empleado con las espinas. Los analitos se cuantificaron en disolución por ICP-MS (con el Agilent 7500ce) del modo anteriormente descrito. Las concentraciones efectivas así determinadas se compararon con las teóricas, y se calcularon los porcentajes de recuperación. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4.25. Como puede observarse, para algunos elementos las concentraciones efectivas están en buen acuerdo con las concentraciones teóricas, siendo la co-precipitación de estos analitos casi cuantitativa. Sin embargo, tal y como se había visto en el estudio preliminar, para algunos analitos las recuperaciones fueron muy pobres. Para el Rb y Hg las recuperaciones se situaron por debajo del 5%, y en el caso del Mg, Sr y Ba fueron en torno al 40%. Estas bajas recuperaciones pueden deberse a los elevados productos de solubilidad ( $K_s$ ), procesos de complejación o a la forma química de los elementos precipitados. Las bajas eficiencias en la precipitación de algunos elementos dejan de manifiesto que es esencial llevar a cabo un cuidadoso análisis de los patrones de calibración de HAp enriquecidos antes de su utilización como calibrantes para determinaciones por LA-ICP-MS.

Tabla 4.25. Concentraciones teóricas de los analitos en los patrones de HAp enriquecidos y concentraciones efectivas con la desviación estándar relativa (RSD, %) cuantificadas mediante ICP-MS en disolución (n= 3).

Analito	Conc. teórica (µg g <sup>-1</sup> )	Conc. efectiva (µg g <sup>-1</sup> )	Analito	Conc. teórica (µg g <sup>-1</sup> )	Conc. efectiva (µg g <sup>-1</sup> )
Mg	0.0	190 (12)	Rb	0.0	0.010 (56)
	2260	1170 (3.9)		2.1	0.091 (8.6)
	6770	2900 (2.7)		6.0	0.165 (2.5)
	13600	4920 (2.5)		18	0.468 (1.4)
Al	0.0	1.5 (12)	Sr	0.0	25
	1.9	3.1 (4.8)		410	180 (2.4)
	6.3	7.3 (2.6)		1000	377 (0.8)
	19	20.7 (2.7)		1700	720 (2.2)
V	0.0	0.012 (17)	Cd	0.0	0.0039 (21)
	0.12	0.121 (4.3)		0.01	0.012 (9.2)
	0.31	0.290 (1.8)		0.04	0.029 (7.7)
	1.1	1.04 (1.8)		0.13	0.076 (7.0)
Mn	0.0	0.131 (1.8)	Ba	0.0	0.057 (7.2)
	3.4	3.35 (1.6)		2.9	0.99 (3.3)
	11	10.68(0.9)		8.7	2.65 (0.8)
	29	27.4 (2.8)		20	6.41 (0.7)
Zn	0.0	1.48 (3.1)	Hg	0.0	0.028 (9.2)
	11	7.8 (2.6)		0.19	0.034 (14)
	54	33.6 (1.7)		0.81	0.041 (7.2)
	200	104 (1.3)		2.7	0.125 (3.9)
As	0.0	0.017(11)	Pb	0.0	0.037 (17)
	0.57	0.587 (0.6)		0.21	0.162 (5.9)
	2.2	2.14 (2.4)		0.62	0.54 (4.3)
	9.2	9.04 (0.2)		1.7	1.39 (1.1)

#### 4.5.3.3. Homogeneidad de los *pellets* de HAp

Dado que la homogeneidad en la composición elemental de los patrones de HAp enriquecidos es un importante parámetro de los mismos, éste fue el siguiente aspecto evaluado. Para ello, se ablacionaron 5 zonas aleatoriamente distribuidas en la superficie de cada *pellet*. Se realizaron ablaciones en línea, de 500 µm de longitud, con las condiciones de operación especificadas en la Tabla 4.22 y se calculó la reproducibilidad de las medidas en términos de desviación estándar relativa (RSD, %). Tal y como puede observarse en la Tabla 4.26, en la mayoría de los casos la reproducibilidad de las señales fue inferior al 15 %. Los valores más altos de RSD corresponden, en general, con los elementos de menor concentración. Estos resultados demuestran que el método utilizado para la co-precipitación de HAp da lugar a una distribución homogénea de los analitos seleccionados en el polvo obtenido.



Tabla 4.26. Homogeneidad de los *pellets* de HAp enriquecidos. Condiciones experimentales de LA-ICP-MS según Tabla 4.22.

Analito	Reproducibilidad RSD % (n = 5)		
	HAp Nivel 1	HAp Nivel 2	HAp Nivel 3
<sup>24</sup> Mg	8.8	8.4	7.1
<sup>27</sup> Al	24	16	9.9
<sup>51</sup> V	6.7	6.1	1.6
<sup>55</sup> Mn	9.2	9.7	2.4
<sup>66</sup> Zn	13	7.8	14
<sup>75</sup> As	19	13	11
<sup>85</sup> Rb	10	3.4	12
<sup>86</sup> Sr	10	9.5	13
<sup>111</sup> Cd	13	17	11
<sup>138</sup> Ba	8.3	10	10
<sup>202</sup> Hg	19	14	14
<sup>208</sup> Pb	23	15	15

#### 4.5.4. Evaluación analítica del método LA-ICP-MS

Para llevar a cabo la evaluación analítica del método se realizaron, en primer lugar, los calibrados para cada uno de los analitos, trabajando siempre en las condiciones de operación de LA-ICP-MS previamente descritas.

Una vez realizados los calibrados, se calcularon los límites de detección y a continuación se llevó a cabo el estudio de la exactitud y precisión del método analítico analizando un material certificado de referencia.

##### 4.5.4.1. Calibrado del método

Los *pellets* de los patrones de HAp enriquecidos fueron analizados según el método propuesto y se estudió la variación de la respuesta con la concentración, obteniéndose las rectas de calibrado correspondientes. Como se recoge en la Tabla 4.27, los análisis resultaron en una buena relación lineal para la mayoría de los analitos, confirmando la buena correlación entre la señal de respuesta del aerosol obtenido tras la ablación y las concentraciones calculadas de los patrones de calibración de HAp enriquecidos. Para la mayoría de los elementos objeto de estudio el coeficiente de correlación fue superior a 0.991. El Cd y Hg presentaron peores correlaciones, principalmente por sus bajas

concentraciones y la incertidumbre asociada con la determinación por ICP-MS de estos elementos en los patrones de HAP enriquecidos. En la Figura 4.21 se muestran las rectas de calibrado obtenidas para los 12 analitos objeto de estudio.

Tabla 4.27. Intervalo de concentración, pendiente, ordenada en el origen y coeficiente de correlación para las rectas de calibrado de los analitos. Condiciones experimentales de LA-ICP-MS según Tabla 4.22.

Analito	Intervalo de concentración ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Pendiente $\pm$ SD	Ordenada en el origen $\pm$ SD	Coficiente de correlación, r
$^{24}\text{Mg}$	190- 4920	$310 \pm 10$	$-3.8 \cdot 10^4 \pm 2.8 \cdot 10^4$	0.9948
$^{27}\text{Al}$	1.5- 20.7	$371 \pm 24$	$-580 \pm 264$	0.9936
$^{51}\text{V}$	0.012- 1.04	$585 \pm 5$	$-4 \pm 3$	0.9997
$^{55}\text{Mn}$	0.131- 27.4	$789 \pm 5$	$-240 \pm 80$	0.9980
$^{66}\text{Zn}$	1.48- 104	$74 \pm 2$	$-190 \pm 120$	0.9981
$^{75}\text{As}$	0.017- 9.04	$54 \pm 1$	$38 \pm 7$	0.9982
$^{85}\text{Rb}$	0.010- 0.468	$573 \pm 7$	$-4 \pm 2$	0.9993
$^{86}\text{Sr}$	25 - 720	$83 \pm 3$	$-1.3 \cdot 10^3 \pm 1.1 \cdot 10^3$	0.9980
$^{111}\text{Cd}$	0.0039- 0.076	$65 \pm 7$	$0.2 \pm 0.3$	0.9690
$^{138}\text{Ba}$	0.057- 6.41	$569 \pm 18$	$-30 \pm 60$	0.9915
$^{202}\text{Hg}$	0.028- 0.125	$132 \pm 4$	$-1.1 \pm 0.3$	0.9703
$^{208}\text{Pb}$	0.037- 1.39	$203 \pm 9$	$-1.3 \pm 0.2$	0.9997

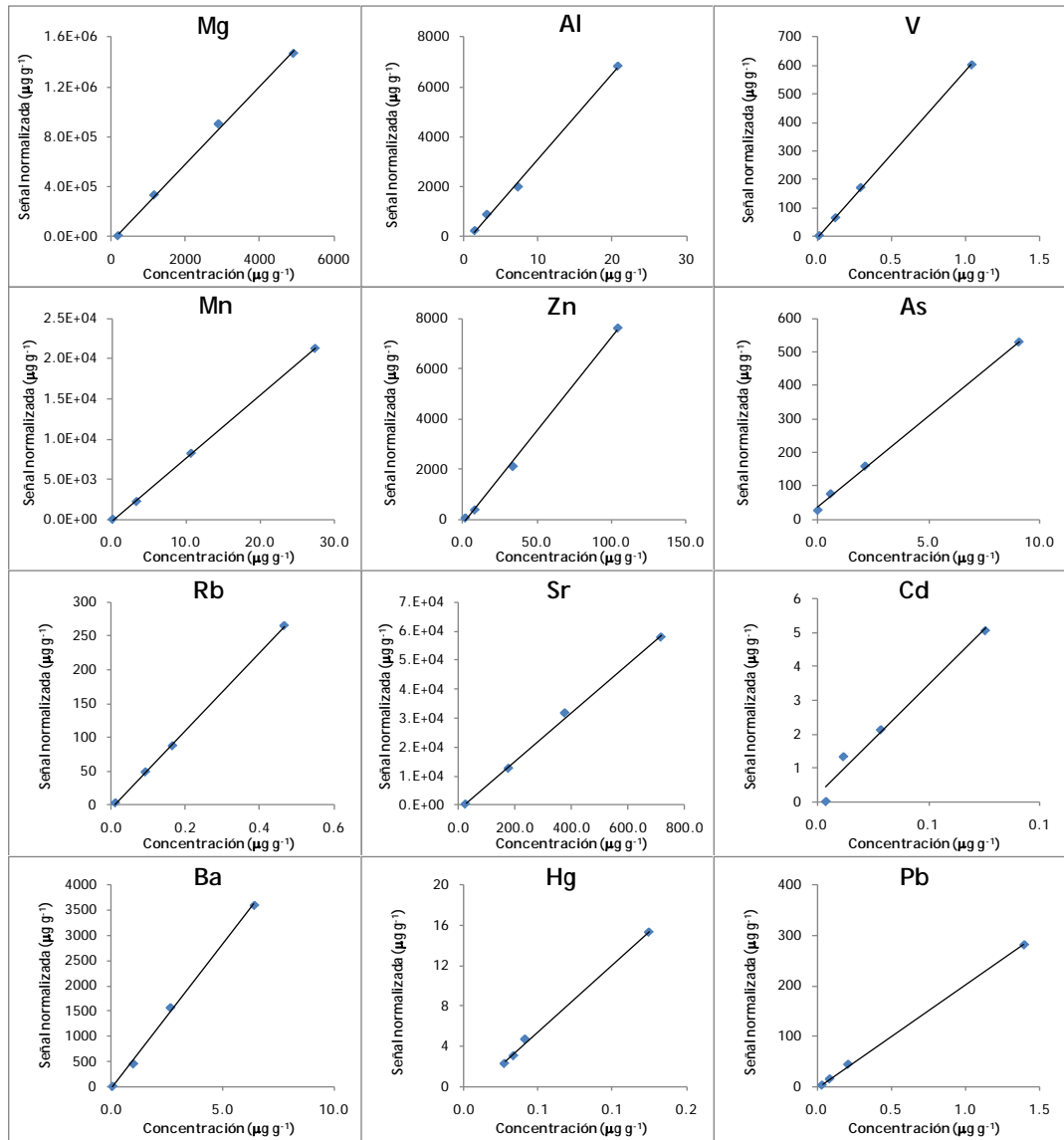


Figura 4.21. Rectas de calibrado obtenidas con los patrones de HAP co-precipitados con los 12 analitos prensados en *pellets*. Condiciones experimentales de LA-ICP-MS según Tabla 4.22. La señal normalizada corresponde con: (Señal analito/ Señal Ca) x [Ca].

#### 4.5.4.2. Límites de detección

El cálculo del límite de detección se realizó de acuerdo al criterio IUPAC, que lo define como 3 veces la desviación estándar del ruido dividido entre la pendiente de la recta de calibrado. En este trabajo para estimar el ruido se realizaron 5 medidas de las señales correspondientes a los analitos en un blanco de gas (He), que se normalizaron con la

señal posterior de Ca de un patrón de HAp blanco (no enriquecido) y su concentración. La presencia de analitos en el patrón blanco de HAp lo hacía inapropiado para el cálculo del ruido. Sin embargo, fue necesaria su utilización para tener una señal de Ca con la que normalizar el ruido del blanco de gas, ya que los calibrados se hicieron, como se ha visto, con señales normalizadas con Ca.

Según este criterio se procedió al cálculo del LOD del método analítico para cada uno de los analitos estudiados expresándose en  $\text{ng g}^{-1}$ . Dichos valores aparecen recogidos en la Tabla 4.28. Como se observa, los LODs oscilaron entre  $1.4 \text{ ng g}^{-1}$  para el Cd y  $751 \text{ ng g}^{-1}$  para Al.

Tabla 4.28. Valores de los límites de detección ( $\text{ng g}^{-1}$ ) de los analitos objeto de estudio. Condiciones experimentales de LA-ICP-MS según Tabla 4.22.

Analito	LOD ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Analito	LOD ( $\text{ng g}^{-1}$ )	Analito	LOD ( $\text{ng g}^{-1}$ )
$^{24}\text{Mg}$	45	$^{66}\text{Zn}$	82	$^{111}\text{Cd}$	1.4
$^{27}\text{Al}$	750	$^{75}\text{As}$	130	$^{138}\text{Ba}$	4.6
$^{51}\text{V}$	2.1	$^{85}\text{Rb}$	6.1	$^{202}\text{Hg}$	7.0
$^{55}\text{Mn}$	25	$^{86}\text{Sr}$	14	$^{208}\text{Pb}$	3.6

#### 4.5.4.3. Exactitud y precisión

Con el objetivo de evaluar la exactitud de los patrones de HAp enriquecidos como calibrantes para el método analítico desarrollado, se llevo a cabo el análisis del material certificado de referencia "SRM 1486 Bone Meal" del NIST de harina de hueso. Este CRM está certificado para 8 elementos, de entre los cuales 4 coinciden con analitos seleccionados en este estudio: Mg, Zn, Sr y Pb. Para otros elementos el NIST proporciona valores no certificados, y de algunos otros se recogen valores en bibliografía. Así, se procedió a analizar el SRM 1486 pelletizado frente a las rectas de calibrado obtenidas con los patrones de HAp enriquecidos. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.29, donde se observa que el contenido de los analitos determinado por LA-ICP-MS está en buen acuerdo con los valores certificados y dentro de la desviación estándar de la medida<sup>186</sup>. Para los analitos no certificados para los cuales hay concentraciones de referencia se obtuvieron igualmente resultados

satisfactorios. Ello confirma la fiabilidad de los patrones de HAp enriquecidos sintetizados.

Tabla 4.29. Resultados del análisis cuantitativo del “SRM 1486 Bone Meal” mediante LA-ICP-MS con calibración *matrix-matched* utilizando los patrones de HAp enriquecidos sintetizados. Concentraciones en  $\mu\text{g g}^{-1}$  e incertidumbre asociada a un intervalo de confianza del 95%.

Analito	Valores de referencia ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Concentraciones determinadas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , n =5)
Mg	4660 $\pm$ 170 <sup>a</sup>	4629 $\pm$ 328
Al	<1 <sup>b</sup>	1.6 $\pm$ 0.3
V	0.07 $\pm$ 0.02 <sup>c</sup>	0.059 $\pm$ 0.005
Mn	1 <sup>b</sup>	1.2 $\pm$ 0.2
Zn	147 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	144 $\pm$ 14
As	0.006 <sup>b</sup>	< LOD
Rb	-	0.35 $\pm$ 0.08
Sr	264 $\pm$ 7 <sup>a</sup>	276 $\pm$ 5
Cd	0.003 <sup>b</sup>	0.002 $\pm$ 0.001
Ba	270 $\pm$ 7 <sup>c</sup>	266 $\pm$ 59
Hg	<0.05 <sup>d</sup>	0.030 $\pm$ 0.006
Pb	1.335 $\pm$ 0.014 <sup>a</sup>	1.3 $\pm$ 0.2

<sup>a</sup> Valores certificados proporcionados por el NIST.

<sup>b</sup> Valores no certificados proporcionados por el NIST.

<sup>c</sup> De Zaichick y cols.<sup>176</sup>

<sup>d</sup> De Dolan y cols.<sup>177</sup>

#### 4.5.4.4. Comparación de la calibración *matrix-matched* con la *non matrix-matched*

Con el objetivo de evaluar la influencia de la calibración *matrix-matching calibration* se compararon los resultados obtenidos para la cuantificación elemental en el material de referencia “SRM 1486 Bone Meal” mediante calibración externa utilizando los patrones co-precipitados de HAp enriquecidos y los obtenidos mediante calibración con el vidrio NIST 612 (*non matrix-matched calibration*).

Para la calibración *non-matrix-matching*, se utilizó el método descrito por Longerich y cols.<sup>49</sup>. De este modo, las señales normalizadas fueron convertidas a concentración utilizando la siguiente ecuación:

$$C_{A,S} = \frac{Señal_{A,S}}{S}$$

Ecuación 4.17

Donde:

- Señal<sub>A,S</sub> es la señal media normalizada (datos sin procesar resueltos en el tiempo adquiridos en cuentas por segundo -cps- a los que se resta la intensidad media del blanco, también en cps, para normalizarlos después frente al patrón interno) del analito en la muestra
- S es la sensibilidad normalizada (en g µg<sup>-1</sup>)

La sensibilidad normalizada, S, se determina en el patrón de calibración (vidrio NIST 612, en este caso), y corrige las variaciones en la masa de muestra ablacionada. Se determina en base a la siguiente ecuación:

$$S = \frac{Señal_{A,Cal} \cdot Con_{IS,Cal}}{Con_{A,Cal} \cdot Con_{IS,S}}$$

Ecuación 4.18

Donde:

- Señal<sub>A,Cal</sub> es la señal media normalizada del analito en el patrón de calibración
- Con<sub>A,Cal</sub> es la concentración del analito en el patrón de calibración
- Con<sub>IS,Cal</sub> y Con<sub>IS,S</sub> son las concentraciones de patrón interno en el patrón de calibración y en la muestra, respectivamente

Existe una pequeña diferencia entre el método propuesto por Longerich y cols. y el aquí propuesto. En cualquier caso, la diferencia con el método original de Longerich y cols. radica simplemente en el orden de las operaciones y las concentraciones calculadas de ambas formas son idénticas.

En este caso el patrón de calibración utilizado fue, como se ha comentado, el vidrio NIST 612. De entre los 12 analitos seleccionados en este estudio este CRM se encuentra certificado para 4 de ellos: Al, Rb, Sr y Pb. Sin embargo, se pueden obtener valores de

referencia para 7 de los 8 restantes (todos excepto el Hg) de la base de datos en línea de GeoReM<sup>187</sup>, y calcular así las correspondientes sensibilidades normalizadas. Al igual que para la calibración *matrix-matched*, para la *non matrix-matching* también se utilizó la intensidad del Ca para la normalización.

La comparativa entre los resultados obtenidos con la calibración *matrix-matching* utilizando los patrones de HAP sintetizados y con la calibración *non matrix-matching* utilizando el NIST 612 se recogen en la Tabla 4.30.

Tabla 4.30. Resultados del análisis cuantitativo del "SRM 1486 Bone Meal" mediante LA-ICP-MS con calibración *matrix-matched* y *non matrix-matched*. Concentraciones en  $\mu\text{g g}^{-1}$  e incertidumbre asociada a un intervalo de confianza del 95%.

Analito	Valores de referencia ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Concentraciones determinadas ( $\mu\text{g g}^{-1}$ , n= 5)	
		<i>Matrix-matched calibration</i>	<i>Non matrix-matched calibration</i>
Mg	4660 ± 170 <sup>a</sup>	4629 ± 328	5200 ± 571
Al	<1 <sup>b</sup>	1.6 ± 0.3	0.9 ± 0.1
V	0.07 ± 0.02 <sup>c</sup>	0.059 ± 0.005	0.05 ± 0.02
Mn	1 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.3
Zn	147 ± 16 <sup>a</sup>	144 ± 14	101 ± 10
As	0.006 <sup>b</sup>	< LOD	0.3 ± 0.2
Rb	-	0.35 ± 0.08	0.35 ± 0.07
Sr	264 ± 7 <sup>a</sup>	276 ± 5	310 ± 45
Cd	0.003 <sup>b</sup>	0.002 ± 0.001	0.006 ± 0.004
Ba	270 ± 7 <sup>c</sup>	266 ± 59	314 ± 46
Hg	<0.05 <sup>d</sup>	0.030 ± 0.006	-
Pb	1.335 ± 0.014 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.4

<sup>a</sup> Valores certificados proporcionados por el NIST.

<sup>b</sup> Valores no certificados proporcionados por el NIST.

<sup>c</sup> De Zaichick y cols.<sup>176</sup>

<sup>d</sup> De Dolan y cols.<sup>177</sup>

En lo que se refiere a los analitos certificados en el SRM 1486 Mg, Zn, Sr y Pb, en los resultados obtenidos con la calibración *non matrix-matching* para el Mg, Sr y Pb las incertidumbres asociadas a las concentraciones calculadas fueron mayores que las obtenidas con la calibración *matrix-matching*. Además, para Mg y Sr las concentraciones determinadas calibrando con el vidrio NIST 612 fueron menos exactas, mientras que la concentración calculada para Zn fue menor que la concentración certificada, lo que podría indicar un efecto de fraccionamiento elemental. Para el Pb, sin embargo, la

diferencia entre las concentraciones calculadas con ambos métodos fue menor, aunque el método *matrix-matched* produjo asimismo un resultado más preciso.

En cuanto al resto de analitos no certificados en el material de referencia SRM 1486, en el caso del V, Mn y Cd las incertidumbres asociadas con la concentración calculada mediante la calibración *non matrix-matching* fueron mayores que con la *matrix-matching*, siendo para el Al, Ba y Rb menores con la calibración *non matrix-matching*. Sin embargo, en ambos casos estas incertidumbres fueron del mismo orden para ambas estrategias de calibración. Por otro lado, la concentración calculada para Al con los patrones de HAp sintetizados ( $1.6 \pm 0.3 \mu\text{g g}^{-1}$ ), aunque se desvía ligeramente del valor de referencia ( $< 1$ ), concuerda con el resultado obtenido por Tang y cols.<sup>188</sup> ( $1.3 \pm 0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

#### 4.5.5. Aplicación de la metodología analítica desarrollada a muestras reales

Aunque no constituye el objetivo principal de este estudio discutir la incorporación de metales en tejidos calcificados, se mostrarán dos ejemplos que ilustran la utilización de los patrones de calibración de HAp sintetizados para la cuantificación de elementos en la primera espina dorsal de túnidos.

Para el estudio de los perfiles de concentración de los analitos en la espina dorsal, se tomó la señal de  $^{43}\text{Ca}$  como un indicador de la matriz de HAp, y en consecuencia, las concentraciones no se calcularon para las zonas donde se observaron grandes caídas en la señal de  $^{43}\text{Ca}$ , correspondientes probablemente a zonas porosas en el núcleo de la espina. Puesto que las ablaciones se realizaron a una velocidad de traslación constante, las coordenadas temporales de los datos individuales se transformaron en distancia. La distancia cero correspondió con el borde de la espina.

En la Figura 4.22 se muestra el primer ejemplo, correspondiente a una muestra de atún rojo (*Thunnus thynnus*). La primera imagen (a) es una fotografía de microscopio del área ablacionada, donde se observan 2 anillos de crecimiento. Como se aprecia en las gráficas, algunos elementos, como el Mn y V (Fig. 4.22b y c, respectivamente),



mostraron incrementos en la concentración en varios puntos, marcados con flechas rojas en la imagen. El primer incremento de concentración apareció al principio de la segunda zona opaca de la espina dorsal (a aproximadamente 450  $\mu\text{m}$  del borde) correspondiendo con el principio de la estación templada. El siguiente pico de concentración se dio en el segundo anillo (a  $\sim 700$   $\mu\text{m}$  del borde), correspondiendo con el invierno dos años anterior a la muerte del individuo. El último anillo de concentración se mostró en la zona opaca anterior a este segundo anillo (a  $\sim 900$   $\mu\text{m}$  del borde). El Pb únicamente mostró un pico de concentración a aproximadamente 700  $\mu\text{m}$  del borde, en el segundo anillo (Fig. 4.22c). El Mg, Al, Zn, As, Rb y Ba mostraron perfiles de concentración similares al del Pb. El Sr, en cambio, mostró una concentración constante a lo largo de la línea ablacionada, de en torno a 700  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Fig 4.22b). El Cd y Hg, por su parte, se encontraron a bajos niveles de concentración, de 0.04 y 0.05  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

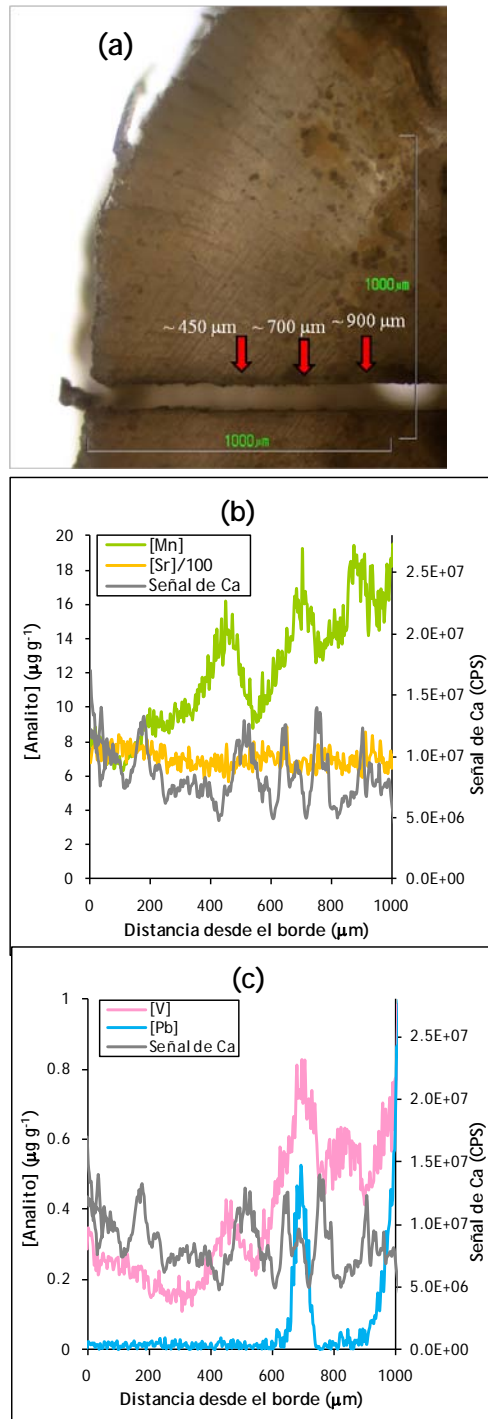


Figura 4.22. Ablación de la primera espina dorsal de un atún rojo (*Thunnus thynnus*): (a) Fotografía de la zona ablacionada; (b) Perfiles de concentración de Mn y Sr con la señal bruta de  $^{43}\text{Ca}$ ; (c) Perfiles de concentración de V y Pb junto con la señal bruta de  $^{43}\text{Ca}$ . Condiciones experimentales de LA-ICP-MS según Tabla 4.22.

El segundo ejemplo, que se presenta en la Figura 4.23, es de una muestra de bonito (*Thunnus alalunga*) que mostró perfiles de concentración parecidos. En este caso, apareció un pico de concentración a aproximadamente 560  $\mu\text{m}$  del borde de la espina, en la segunda zona opaca (época caliente), para algunos elementos (que se muestra para el Mn, Ba, V y Pb en la Fig. 4.23b y c, pero que también se observó para el Mg, Al, Zn, As y Rb). Al igual que en el primer ejemplo, el Sr presentó una concentración constante a lo largo del área ablacionada con una concentración media de 685  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Fig. 4.23b) y Cd y Hg mostraron bajos niveles de concentración, al mismo nivel que en la muestra de atún rojo.

Una concentración constante de Sr era de esperar teniendo en cuenta que los túnidos son especies oceánicas, ya que la concentración de Sr es relativamente constante en los hábitats marinos<sup>130</sup>. En cuanto a la interpretación de los incrementos de concentración observados para algunos de los analitos, está más allá del alcance de este trabajo y requeriría un mayor conocimiento de las muestras analizadas (zona de captura, movimientos migratorios, etc).

En el anexo de este trabajo (CD-Rom adjunto) se recogen los perfiles de concentración obtenidos para las muestras de espina dorsal de atún rojo y bonito analizadas por LA-ICP-MS mediante la metodología desarrollada.

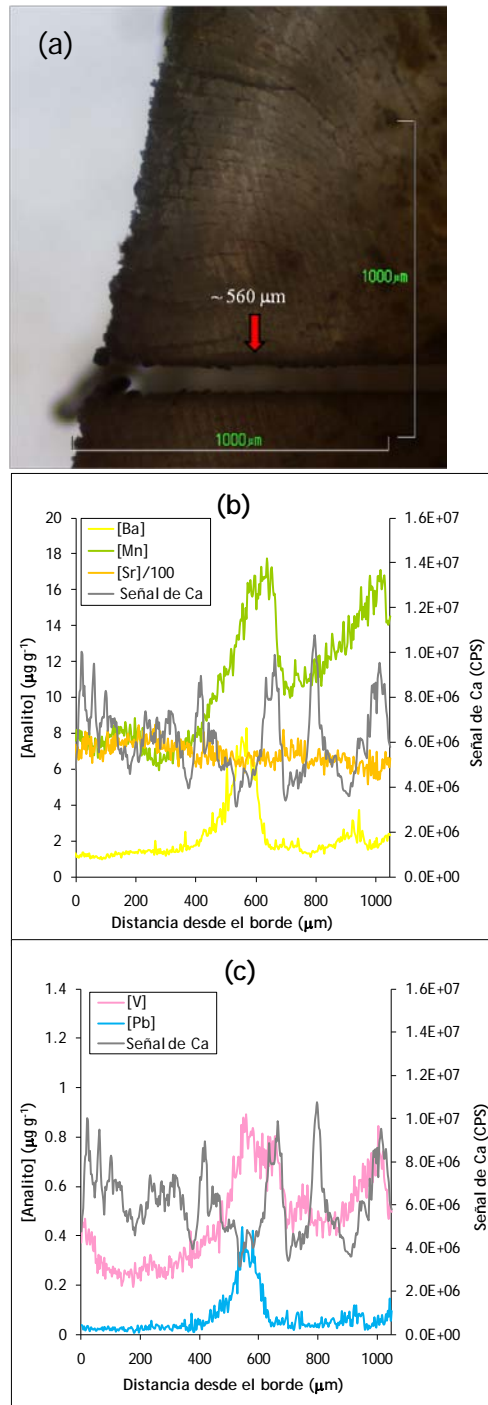


Figura 4.23. Ablación de la primera espina dorsal de un bonito (*Thunnus alalunga*): (a) Fotografía de la zona ablacionada; (b) Perfiles de concentración de Mn, Ba y Sr con la señal bruta de  $^{43}\text{Ca}$ ; (c) Perfiles de concentración de V y Pb junto con la señal bruta de  $^{43}\text{Ca}$ . Condiciones experimentales de LA-ICP-MS según Tabla 4.22.

## 4.6. Conclusions

Taking into account the proposed objectives and the results obtained in this study, it can be concluded that:

1. The developed solution-based ICP-MS method has enabled the quantification of 21 elements (B, Mg, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Pd, Cd, Ba, La, Hg, Pb) in tuna fish muscle and 19 elements in dorsal spine after microwave assisted digestion in a sensitive and accurate way. The effectiveness of the acid digestion procedure has been supported by evaluation using ID analysis.
2. This method has been applied to muscle and first dorsal spine of a total of 34 samples of albacore and bluefin tuna. Concentrations of Pb, Cd, Ni, Zn, Cu and Cr obtained from muscle samples were below the limits set by the FAO, EC and the EPA. However, 10 muscle samples had Hg concentrations higher than those set by the EPA, and 4 of them were above the limits established by the EC, indicating a potential risk to human health.
3. There is a linear relationship between concentrations in muscle and first spine of the first dorsal fin for Zn, As, Rb, Cd and Hg in albacore and for Rb, As, Se, Cd and Hg for bluefin tuna. Furthermore, the concentrations of As, Se, Rb and Hg in muscle were higher than in spine, which suggests that the linear positive correlation between muscle and first dorsal spine could be due to a higher bioaccumulation of these elements in muscle.

4. The devised procedure for the co-precipitation of 12 analytes into the hydroxyapatite matrix has turned out adequate for the production of homogeneous solid calibration standards for LA-ICP-MS analyses.
5. The availability of these standards has enabled quantitative analysis of the reference material SRM 1486, obtaining values in good agreement with the certified ones, and more accurate and precise than the values obtained by non matrix-matched calibration.
6. Once the calibration standards are prepared, the ease and rapidity of the analysis has been demonstrated, without tedious sample preparation steps.
7. The preliminary information shows interesting variations for some of the analysed elements in Atlantic bluefin tuna and albacore tuna samples.
8. The obtained results will make it possible to use the developed LA-ICP-MS methodology for the measurement of metals in the first dorsal spine in future studies on marine pollution, migration of tuna fish and / or bioaccumulation of trace elements in these species. It is also noticeable that the produced solid standards could be used for bone analysis by LA-ICP-MS since the matrix, HAp, is the same for fishbone and bone.

## Bibliografía

- [1] GRAY, A.L. Solid sample introduction by laser ablation for inductively coupled plasma source mass spectrometry. *Analyst*, 1985, 110 (5), 551-556.
- [2] PISONERO, J., FERNÁNDEZ, B. y GÜNTHER, D. Critical revision of GD-MS, LA-ICP-MS and SIMS as inorganic mass spectrometric techniques for direct solid analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009, 24 (9), 1145-1160.
- [3] HATTENDORF, B., LATKOCZY, C. y GÜNTHER, D. Laser ablation-ICPMS. *Analytical Chemistry*, 2003, 75 (15), 341A-347A.
- [4] FERNÁNDEZ, B., CLAVERIE, F., PÉCHEYRAN, C. y DONARD, O.F.X. Direct analysis of solid samples by fs-LA-ICP-MS. *Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26 (10), 951-966.
- [5] RUSSO, R.E., MAO, X., LIU, H., GONZÁLEZ, J. y MAO, S.S. Laser ablation in analytical chemistry - a review. *Talanta*, 2002, 57 (3), 425-451.
- [6] FELDMANN, J., KINDNESS, A. y EK, P. Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, 17 (8), 813-818.
- [7] BECKER, J.S. Applications of inductively coupled plasma mass spectrometry and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry in materials science. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 2002, 57B (12), 1805-1820.
- [8] CLAVERIE, F. Développement et applications d'un système laser femtoseconde infra-rouge basse énergie et haute cadence de tir pour l'analyse d'éléments trace dans les solides par couplage Ablation Laser / ICPMS [Tesis doctoral]. Pau: Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2009.
- [9] GÜNTHER, D. y HATTENDORF, B. Solid sample analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005, 24 (3), 255-265.
- [10] GÜNTHER, D., FRISCHKNECHT, R., HEINRICH, C.A. y KAHLERT, H.J. Capabilities of an argon fluoride 193 nm excimer laser for laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry microanalysis of geological materials. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1997, 12 (9), 939-944.
- [11] TELOUK, P., ROSE-KOGA, E.F. y ALBAREDE, F. Preliminary results from a new 157 nm laser ablation ICP-MS instrument: New opportunities in the analysis of solid samples. *Geostandards Newsletter*, 2003, 27 (1), 5-11.
- [12] GEERTSEN, C., BRIAND, A., CHARTIER, F., LACOUR, J.L., MAUCHIEN, P., SJOESTROEM, S. y MERMET, J.M. Comparison between infrared and ultraviolet laser ablation at atmospheric pressure - implications for solid sampling inductively coupled plasma spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1994, 9 (1), 17-22.
- [13] JEFFRIES, T.E., PEARCE, N.J.G., PERKINS, W.T. y RAITH, A. Chemical fractionation during infrared and ultraviolet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry-implications for mineral microanalysis. *Analytical Communications*, 1996, 33 (1), 35-39.

- [14] HEMMERLIN, M. y MERMET, J.M. Determination of elements in polymers by laser ablation inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: effect of the laser beam wavelength, energy and masking on the ablation threshold and efficiency. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 1996, 51B (6), 579-589.
- [15] RUSSO, R.E., MAO, X.L., BORISOV, O.V. y LIU, H. Influence of wavelength on fractionation in laser ablation ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, 15 (9), 1115-1120.
- [16] MOTELICA-HEINO, M. y DONARD, O.F.X. Comparison of UV and IR laser ablation ICP-MS on silicate reference materials and implementation of normalization factors for quantitative measurements. *Geostandards Newsletter*, 2001, 25 (2-3), 345-359.
- [17] GUILLONG, M., HORN, I. y GÜNTHER, D. A comparison of 266 nm, 213 nm and 193 nm produced from a single solid state Nd:YAG laser for laser ablation ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003, 18 (10), 1224-1230.
- [18] MARGETIC, V., PAKULEV, A., STOCKHAUS, A., BOLSHOV, M., NIEMAX, K. y HERGENRODER, R. A comparison of nanosecond and femtosecond laser-induced plasma spectroscopy of brass samples. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 2000, 55B (11), 1771-1785.
- [19] JACKSON, S.E., LONGERICH, H.P., DUNNING, G.R. y FRYER, B.J. The application of laser-ablation microprobe-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LAM-ICP-MS) to in situ trace-element determinations in minerals. *Canadian Mineralogist*, 1992, 30 (4), 1049-1064.
- [20] JENNER, G.A., FOLEY, S.F., JACKSON, S.E., GREEN, T.H., FRYER, B.J. y LONGERICH, H.P. Determination of partition coefficients for trace elements in high pressure-temperature experimental run products by laser ablation microprobe-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LAM-ICP-MS). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1993, 57 (23-24), 5099-5103.
- [21] LOUCKS, R.R. Annual Report. Canberra: Australian National University, 1995.
- [22] BEA, F., MONTERO, P., STROH, A. y BAASNER, J. Microanalysis of minerals by an Excimer UV-LA-ICP-MS system. *Chemical Geology*, 1996, 133 (1-4), 145-156.
- [23] FIGG, D. y KAHR, M.S. Elemental fractionation of glass using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Applied Spectroscopy*, 1997, 51 (8), 1185-1192.
- [24] LELOUP, C., MARTY, P., DALL'AVA, D. y PERDEREAU, M. Quantitative analysis for impurities in uranium by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: improvements in the experimental setup. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1997, 12 (9), 945-950.
- [25] JEFFRIES, T.E., JACKSON, S.E. y LONGERICH, H.P. Application of a frequency quintupled Nd:YAG source ( $\lambda=213$  nm) for laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometric analysis of minerals. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1998, 13 (9), 935-940.
- [26] RUSSO, R.E., MAO, X., GONZÁLEZ, J.J. y MAO, S.S. Femtosecond laser ablation ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, 17 (9), 1072-1075.



- [27] HORN, I., GÜNTHER, D. y GUILLONG, M. Evaluation and design of a solid-state 193 nm OPO-Nd:YAG laser ablation system. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 2003, 58B (10), 1837-1846.
- [28] POITRASSON, F., MAO, X., MAO, S.S., FREYDIER, R. y RUSSO, R.E. Comparison of ultraviolet femtosecond and nanosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry analysis in glass, monazite, and zircon. *Analytical Chemistry*, 2003, 75 (22), 6184-6190.
- [29] PÉCHEYRAN, C., CANY, S. y DONARD, O.F.X. Femtosecond laser ablation at high repetition rate and low energy coupled with ICPMS detection: preliminary results. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 2005, 50 (5), 228-239.
- [30] HORN, I., VON BLANCKENBURG, F., SCHOENBERG, R., STEINHOEFEL, G. y MARKL, G. In situ iron isotope ratio determination using UV-femtosecond laser ablation with application to hydrothermal ore formation processes. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2006, 70 (14), 3677-3688.
- [31] BIAN, Q., GARCÍA, C.C., KOCH, J. y NIEMAX, K. Non-matrix matched calibration of major and minor concentrations of Zn and Cu in brass, aluminium and silicate glass using NIR femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2006, 21 (2), 187-191.
- [32] HORN, I., RUDNICK, R.L. y MCDONOUGH, W.F. Precise elemental and isotope ratio determination by simultaneous solution nebulization and laser ablation-ICP-MS: application to U-Pb geochronology. *Chemical Geology*, 2000, 164 (3-4), 281-301.
- [33] GUILLONG, M., HORN, I. y GÜNTHER, D. Capabilities of a homogenized 266 nm Nd:YAG laser ablation system for LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, 17 (1), 8-14.
- [34] BLEINER, D., PLOTNIKOV, A., VOGT, C., WETZIG, K. y GÜNTHER, D. Depth profile analysis of various titanium based coatings on steel and tungsten carbide using laser ablation inductively coupled plasma-"time of flight" mass spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 368 (2-3), 221-226.
- [35] HORN, I., GUILLONG, M. y GÜNTHER, D. Wavelength dependant ablation rates for metals and silicate glasses using homogenized laser beam profiles - implications for LA-ICP-MS. *Applied Surface Science*, 2001, 182 (1-2), 91-102.
- [36] HUANG, Y., SHIBATA, Y. y MORITA, M. Micro laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. 1. Instrumentation and performance of micro laser ablation system. *Analytical Chemistry*, 1993, 65 (21), 2999-3003.
- [37] ARROWSMITH, P. y HUGHES, S.K. Entrainment and transport of laser ablated plumes for subsequent elemental analysis. *Applied Spectroscopy*, 1988, 42 (7), 1231-1239.
- [38] DARKE, S.A. y TYSON, J.F. Interaction of laser radiation with solid materials and its significance to analytical spectrometry. A review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1993, 8 (2), 145-209.
- [39] BLEINER, D. y GÜNTHER, D. Theoretical description and experimental observation of aerosol transport processes in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2001, 16 (5), 449-456.

- [40] FRYER, B.J., JACKSON, S.E. y LONGERICH, H.P. The design, operation and role of the laser-ablation microprobe coupled with an inductively coupled plasma-mass spectrometer (LAM-ICP-MS) in the Earth Sciences. *Canadian Mineralogist*, 1995, 33 (2), 303-312.
- [41] GONZÁLEZ, J., MAO, X.L., ROY, J., MAO, S.S. y RUSSO, R.E. Comparison of 193, 213 and 266 nm laser ablation ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, 17 (9), 1108-1113.
- [42] HOHL, M., KANZARI, A., MICHLER, J., NELIS, T., FUHRER, K. y GONIN, M. Pulsed r.f.-glow-discharge time-of-flight mass spectrometry for fast surface and interface analysis of conductive and non-conductive materials. *Surface and Interface Analysis*, 2006, 38 (4), 292-295.
- [43] GARCÍA, C.C., LINDNER, H. y NIEMAX, K. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry-current shortcomings, practical suggestions for improving performance, and experiments to guide future development. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009, 24 (1), 14-26.
- [44] KUHN, H.R. y GÜNTHER, D. Elemental fractionation studies in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry on laser-induced brass aerosols. *Analytical Chemistry*, 2003, 75 (4), 747-753.
- [45] JACKSON, S.E. y GÜNTHER, D. The nature and sources of laser induced isotopic fractionation in laser ablation-multicollector-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003, 18 (3), 205-212.
- [46] PISONERO, J. y GÜNTHER, D. Femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: fundamentals and capabilities for depth profiling analysis. *Mass Spectrometry Reviews*, 2008, 27 (6), 609-623.
- [47] KOCH, J., VON BOHLEN, A., HERGENRODER, R. y NIEMAX, K. Particle size distributions and compositions of aerosols produced by near-IR femto- and nanosecond laser ablation of brass. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004, 19 (2), 267-272.
- [48] LIU, C., MAO, X.L., MAO, S.S., ZENG, X., GREIF, R. y RUSSO, R.E. Nanosecond and femtosecond laser ablation of brass: particulate and ICPMS measurements. *Analytical Chemistry*, 2004, 76 (2), 379-383.
- [49] LONGERICH, H.P., JACKSON, S.E. y GÜNTHER, D. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometric transient signal data acquisition and analyte concentration calculation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1996, 11 (9), 899-904.
- [50] WESTHEIDE, J.T., BECKER, J.S., JAEGER, R., DIETZE, H.-J. y BROEKAERT, J.A.C. Analysis of ceramic layers for solid oxide fuel cells by laser ablation inductively coupled plasma mass spectroscopy. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1996, 11 (9), 661-666.
- [51] ODEGARD, M., MANSFELD, J. y DUNDAS, S.H. Preparation of calibration materials for microanalysis of Ti minerals by direct fusion of synthetic and natural materials: Experience with LA-ICP-MS analysis of some important minor and trace elements in ilmenite and rutile. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 370 (7), 819-827.
- [52] BARATS, A., PÉCHEYRAN, C., AMOUROUX, D., DUBASCOUX, S., CHAUVAUD, L. y DONARD, O.F.X. Matrix-matched quantitative analysis of trace-elements in calcium carbonate

shells by laser-ablation ICP-MS: application to the determination of daily scale profiles in scallop shell (*Pecten maximus*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387 (3), 1131-1140.

[53] CHENERY, S. y COOK, J.M. Determination of rare earth elements in single mineral grains by laser ablation microprobe-inductively coupled plasma mass spectrometry - Preliminary study. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1993, 8 (2), 299-303, 292 plates.

[54] CROMWELL, E.F. y ARROWSMITH, P. Semiquantitative analysis with laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1995, 67 (1), 131-138.

[55] GÜNTHER, D., COUSIN, H., MAGYAR, B. y LEOPOLD, I. Calibration studies on dried aerosols for laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1997, 12 (2), 165-170.

[56] GÜNTHER, D., FRISCHKNECHT, R., MUSCHENBORN, H.J. y HEINRICH, C.A. Direct liquid ablation. A new calibration strategy for laser ablation-ICP-MS microanalysis of solids and liquids. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1997, 359 (4-5), 390-393.

[57] SELA, H., KARPAS, Z., ZORIY, M., PICKHARDT, C. y BECKER, J.S. Biomonitoring of hair samples by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *International Journal of Mass Spectrometry*, 2007, 261 (2-3), 199-207.

[58] BOULYGA, S.F., HEILMANN, J., PROHASKA, T. y HEUMANN, K.G. Development of an accurate, sensitive, and robust isotope dilution laser ablation ICP-MS method for simultaneous multi-element analysis (chlorine, sulfur, and heavy metals) in coal samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389 (3), 697-706.

[59] FERNÁNDEZ, B., CLAVERIE, F., PÉCHEYRAN, C. y DONARD, O.F.X. Solid-spiking isotope dilution laser ablation ICP-MS for the direct and simultaneous determination of trace elements in soils and sediments. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2008, 23 (3), 367-377.

[60] FERNÁNDEZ, B., CLAVERIE, F., PÉCHEYRAN, C., ALEXIS, J. y DONARD, O.F.X. Direct determination of trace elements in powdered samples by in-cell isotope dilution femtosecond laser ablation ICPMS. *Analytical Chemistry*, 2008, 80 (18), 6981-6994.

[61] VOGT, C. y LATKOCZY, C. Laser Ablation ICP-MS, in *Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook* (Ed. Nelms, Simon M.). Oxford: Blackwell Publishing Ltd., 2005. ISBN: 9781405109161.

[62] GUILLONG, M. y GÜNTHER, D. Effect of particle size distribution on ICP-induced elemental fractionation in laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2002, 17 (8), 831-837.

[63] DURRANT, S.F. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: achievements, problems, prospects. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999, 14 (9), 1385-1403.

[64] AESCHLIMAN, D.B., BAJIC, S.J., BALDWIN, D.P. y HOUK, R.S. Spatially-resolved analysis of solids by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: trace elemental quantification without matrix-matched solid standards. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003, 18 (8), 872-877.

- [65] EGGINS, S.M., KINSLEY, L.P.J. y SHELLEY, J.M.G. Deposition and element fractionation processes during atmospheric pressure laser sampling for analysis by ICP-MS. *Applied Surface Science*, 1998, 127-129 278-286.
- [66] GÜNTHER, D. y HEINRICH, C.A. Enhanced sensitivity in laser ablation-ICP mass spectrometry using helium-argon mixtures as aerosol carrier. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999, 14 (9), 1363-1368.
- [67] MANK, A.J.G. y MASON, P.R.D. A critical assessment of laser ablation ICP-MS as an analytical tool for depth analysis in silica-based glass samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999, 14 (8), 1143-1153.
- [68] HORN, I. y GÜNTHER, D. The influence of ablation carrier gasses Ar, He and Ne on the particle size distribution and transport efficiencies of laser ablation-induced aerosols: implications for LA-ICP-MS. *Applied Surface Science*, 2003, 207 (1-4), 144-157.
- [69] VON ALLMEN, M. Laser-beam interactions with materials: physical principles and applications. New York: Springer, 1986. ISBN: 9783540594017.
- [70] JACKSON, S.E., PEARSON, N.J., GRIFFIN, W.L. y BELOUSOVA, E.A. The application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry to in situ U-Pb zircon geochronology. *Chemical Geology*, 2004, 211 (1-2), 47-69.
- [71] FISHER, C.M., LONGERICH, H.P., JACKSON, S.E. y HANCHAR, J.M. Data acquisition and calculation of U-Pb isotopic analyses using laser ablation (single collector) inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2010, 25 (12), 1905-1920.
- [72] HEINRICH, C.A., PETTKE, T., HALTER, W.E., AIGNER-TORRES, M., AUDETAT, A., GÜNTHER, D., HATTENDORF, B., BLEINER, D., GUILLONG, M. y HORN, I. Quantitative multi-element analysis of minerals, fluid and melt inclusions by laser-ablation inductively-coupled-plasma mass-spectrometry. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2003, 67 (18), 3473-3497.
- [73] GUILLONG, M., LATKOCZY, C., SEO, J.H., GÜNTHER, D. y HEINRICH, C.A. Determination of sulfur in fluid inclusions by laser ablation ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2008, 23 (12), 1581-1589.
- [74] STIRLING, C.H., LEE, D.C., CHRISTENSEN, J.N. y HALLIDAY, A.N. High-precision in situ  $^{238}\text{U}$ - $^{234}\text{U}$ - $^{230}\text{Th}$  isotopic analysis using laser ablation multiple-collector ICPMS. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, 64 (21), 3737-3750.
- [75] SOUDERS, A.K. y SYLVESTER, P.J. Accuracy and precision of non-matrix-matched calibration for lead isotope ratio measurements of lead-poor minerals by LA-MC-ICPMS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2010, 25 (7), 975-988.
- [76] GUILLONG, M. y GÜNTHER, D. Quasi "non-destructive" laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry fingerprinting of sapphires. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 2001, 56B (7), 1219-1231.
- [77] ABDURIYIM, A., KITAWAKI, H., FURUYA, M. y SCHWARZ, D. "Paraiba"-type copper-bearing tourmaline from Brazil, Nigeria, and Mozambique: chemical fingerprinting by LA-ICP-MS. *Gems and Gemology*, 2006, 42 (1), 4-21.

- [78] SMIT, Z., JANSSENS, K., BULSKA, E., WAGNER, B., KOS, M. y LAZAR, I. Trace element fingerprinting of Facon-de-Venise glass. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2005, 239 (1-2), 94-99.
- [79] RESANO, M., VANHAECKE, F., HUTSEBAUT, D., DE CORTE, K. y MOENS, L. Possibilities of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry for diamond fingerprinting. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003, 18 (10), 1238-1242.
- [80] NEUFELD, L.M. Methods for the forensic analysis of adhesive tape samples by LA-ICP-MS. Fremont, USA: Agilent Technologies, 2004. Número de publicación: 5989-1566EN.
- [81] WATLING, R.J. Sourcing the provenance of cannabis crops using inter-element association patterns 'fingerprinting' and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1998, 13 (9), 917-926.
- [82] WATLING, R.J., HERBERT, H.K., DELEV, D. y ABELL, I.D. Gold fingerprinting by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 1994, 49B (2), 205-219.
- [83] KOVACS, R., SCHLOSSER, S., STAUB, S.P., SCHMIDERER, A., PERNICKA, E. y GÜNTHER, D. Characterization of calibration materials for trace element analysis and fingerprint studies of gold using LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009, 24 (4), 476-483.
- [84] KOCH, J., FELDMANN, I., HATTENDORF, B., GÜNTHER, D., ENGEL, U., JAKUBOWSKI, N., BOLSHOV, M., NIEMAX, K. y HERGENRODER, R. Trace element analysis of synthetic mono- and poly-crystalline CaF<sub>2</sub> by ultraviolet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry at 266 and 193 nm. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 2002, 57B (6), 1057-1070.
- [85] STEHRER, T., HEITZ, J., PEDARNIG, J.D., HUBER, N., AESCHLIMANN, B., GÜNTHER, D., SCHERNDL, H., LINSMEYER, T., WOLFMEIR, H. y ARENHOLZ, E. LA-ICP-MS analysis of waste polymer materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398 (1), 415-424.
- [86] SELLNER, H., HAMETNER, K., GÜNTHER, D. y SEEBACH, D. Manganese distribution in polystyrene beads prepared by copolymerization with cross-linking dendritic salens using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Catalysis*, 2003, 215 (1), 87-93.
- [87] NEILSEN, J.L., ABILDTRUP, A., CHRISTENSEN, J., WATSON, P., COX, A. y MCLEOD, C.W. Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: a new strategy for speciation of metal binding serum proteins. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 1998, 53B (2), 339-345.
- [88] REN, J., ULVIK, A., REFSUM, H. y UELAND, P.M. Applications of short-chain polydimethylacrylamide as sieving medium for the electrophoretic separation of DNA fragments and mutation analysis in uncoated capillaries. *Analytical Biochemistry*, 1999, 276 (2), 188-194.
- [89] BECKER, J.S., BOULYGA, S.F., BECKER, J.S., PICKHARDT, C., DAMOC, E. y PRZYBYLSKI, M. Structural identification and quantification of protein phosphorylations after gel electrophoretic separation using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry and laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2003, 228 (2-3), 985-997.

- [90] JIMÉNEZ, M.S., GOMEZ, M.T., RODRIGUEZ, L., VELARTE, R. y CASTILLO, J.R. Characterization of metal-humic acid complexes by polyacrylamide gel electrophoresis-laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 676 (1-2), 9-14.
- [91] BECKER, J.S., SELA, H., DOBROWOLSKA, J., ZORIY, M. y BECKER, J.S. Recent applications on isotope ratio measurements by ICP-MS and LA-ICP-MS on biological samples and single particles. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2008, 270 (1-2), 1-7.
- [92] WU, B., ZORIY, M., CHEN, Y. y BECKER, J.S. Imaging of nutrient elements in the leaves of *Elsholtzia splendens* by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Talanta*, 2009, 78 (1), 132-137.
- [93] BECKER, J.S., ZORIY, M., WU, B., MATUSCH, A. y BECKER, J.S. Imaging of essential and toxic elements in biological tissues by LA-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2008, 23 (9), 1275-1280.
- [94] BECKER, J.S., ZORIY, M., BECKER, J.S., DOBROWOLSKA, J. y MATUSCH, A. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) in elemental imaging of biological tissues and in proteomics. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2007, 22 (7), 736-744.
- [95] DOBROWOLSKA, J., DEHNHARDT, M., MATUSCH, A., ZORIY, M., PALOMERO-GALLAGHER, N., KOSCIELNIAK, P., ZILLES, K. y BECKER, J.S. Quantitative imaging of zinc, copper and lead in three distinct regions of the human brain by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 2008, 74 (4), 717-723.
- [96] BECKER, J.S., MATUSCH, A., PALM, C., SALBER, D., MORTON, K.A. y BECKER, J.S. Bioimaging of metals in brain tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and metallomics. *Metallomics*, 2010, 2 (2), 104-111.
- [97] DEVOS, W., MOOR, C. y LIENEMANN, P. Determination of impurities in antique silver objects for authentication by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1999, 14 (4), 621-626.
- [98] DUSSUBIEUX, L. y VAN ZELST, L. LA-ICP-MS analysis of platinum-group elements and other elements of interest in ancient gold. *Applied Physics A: Materials Science & Processing*, 2004, 79 (2), 353-356.
- [99] SARAH, G., GRATUZE, B. y BARRANDON, J.N. Application of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the investigation of ancient silver coins. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2007, 22 (9), 1163-1167.
- [100] DEVOS, W., SENN-LUDER, M., MOOR, C. y SALTER, C. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) for spatially resolved trace analysis of early-medieval archeological iron finds. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 366 (8), 873-880.
- [101] BUGOI, R., CONSTANTINESCU, B., NEELMEIJER, C. y CONSTANTIN, F. The potential of external IBA and LA-ICP-MS for obsidian elemental characterization. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 2004, 226 (1-2), 136-146.

- [102] KYSER, K., CHIPLEY, D., BUKATA, A., POLITO, P., FITZPATRICK, A. y ALEXANDRE, P. Application of laser ablation and high resolution ICPMS to the analysis of metal contents in tree rings, ages of uranium-rich minerals and Se contents in sulphide ores. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy*, 2003, 48 (5), 258-268.
- [103] DAVID, B.J., SATAKE, K., COX, A.J. y MCLEOD, C.W. Application of laser ablation ICP-MS for the analysis of the relative distribution of trace elements between the bark pockets and annual rings of a beech (*Fagus sylvatica* L.) tree. *Eurasian Journal of Forest Research*, 2004, 7-1 21-25.
- [104] NAREWSKI, U., WERNER, G., SCHULZ, H. y VOGT, C. Application of laser ablation inductively coupled mass spectrometry (LA-ICP-MS) for the determination of major, minor, and trace elements in bark samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 366 (2), 167-170.
- [105] WU, B., CHEN, Y. y BECKER, J.S. Study of essential element accumulation in the leaves of a Cu-tolerant plant *Elsholtzia splendens* after Cu treatment by imaging laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *Analytica Chimica Acta*, 2009, 633 (2), 165-172.
- [106] KAISER, J., GALIOVA, M., NOVOTNY, K., CERVENKA, R., REALE, L., NOVOTNY, J., LISKA, M., SAMEK, O., KANICKY, V., HRDLICKA, A., STEJSKAL, K., ADAM, V. y KIZEK, R. Mapping of lead, magnesium and copper accumulation in plant tissues by laser-induced breakdown spectroscopy and laser-ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 2009, 64B (1), 67-73.
- [107] SUZUKI, K. Characterisation of airborne particulates and associated trace metals deposited on tree bark by ICP-OES, ICP-MS, SEM-EDX and laser ablation ICP-MS. *Atmospheric Environment*, 2006, 40 (14), 2626-2634.
- [108] BROWN, R.J.C., JARVIS, K.E., DISCH, B.A., GODDARD, S.L. y BROWN, A.S. Spatial inhomogeneity of metals in particulate matter on ambient air filters determined by LA-ICP-MS and comparison with acid digestion ICP-MS. *Journal of Environmental Monitoring*, 2009, 11 (11), 2022-2029.
- [109] GLIGOROVSKI, S., VAN ELTEREN, J.T. y GRGIC, I. A multi-element mapping approach for size-segregated atmospheric particles using laser ablation ICP-MS combined with image analysis. *Science of the Total Environment*, 2008, 407 (1), 594-602.
- [110] TABOURET, H., BAREILLE, G., CLAVERIE, F., PÉCHEYRAN, C., PROUZET, P. y DONARD, O.F.X. Simultaneous use of strontium:calcium and barium:calcium ratios in otoliths as markers of habitat: Application to the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Adour basin, South West France. *Marine Environmental Research*, 2010, 70 (1), 35-45.
- [111] CAMPANA, S.E. Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine Ecology Progress Series*, 1999, 188 263-297.
- [112] COUTANT, C.C. y CHEN, C.H. Strontium microstructure in scales of fresh-water and estuarine striped bass (*Morone saxatilis*) detected by laser-ablation mass-spectrometry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1993, 50 (6), 1318-1323.
- [113] FARRELL, A.P., HODALY, A.H. y WANG, S. Metal analysis of scales taken from Arctic grayling. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2000, 39 (4), 515-522.

- [114] WELLS, B.K., RIEMAN, B.E., CLAYTON, J.L., HORAN, D.L. y JONES, C.M. Relationships between water, otolith, and scale chemistries of westslope cutthroat trout from the Coeur d'Alene River, Idaho: The potential application of hard-part chemistry to describe movements in freshwater. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2003, 132 (3), 409-424.
- [115] WELLS, B.K., THORROLD, S.R. y JONES, C.M. Stability of elemental signatures in the scales of spawning weakfish, *Cynoscion regalis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2003, 60 (4), 361-369.
- [116] HOLA, M., KALVODA, J., BABEK, O., BRZOBOHATY, R., HOLOUBEK, I., KANICKY, V. y SKODA, R. LA-ICP-MS heavy metal analyses of fish scales from sediments of the Oxbow Lake Certak of the Morava River (Czech Republic). *Environmental Geology*, 2009, 58 (1), 141-151.
- [117] SMITH, S.V., BUDDEMEIER, R.W., REDALJE, R.C. y HOUCK, J.E. Strontium-calcium thermometry in coral skeletons. *Science*, 1979, 204 (4391), 404-407.
- [118] SINCLAIR, D.J., KINSLEY, L.P.J. y MCCULLOCH, M.T. High resolution analysis of trace elements in corals by laser ablation ICP-MS. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1998, 62 (11), 1889-1901.
- [119] MCCULLOCH, M., FALLON, S., WYNDHAM, T., HENDY, E., LOUGH, J. y BARNES, D. Coral record of increased sediment flux to the inner Great Barrier Reef since European settlement. *Nature*, 2003, 421 (6924), 727-730.
- [120] LEA, D.W. y MARTIN, P.A. A rapid mass spectrometric method for the simultaneous analysis of barium, cadmium, and strontium in foraminifera shells. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 1996, 60 (16), 3143-3149.
- [121] BECKER, B.J., FODRIE, F.J., MCMILLAN, P.A. y LEVIN, L.A. Spatial and temporal variation in trace elemental fingerprints of mytilid mussel shells: A precursor to invertebrate larval tracking. *Limnology and Oceanography*, 2005, 50 (1), 48-61.
- [122] THORROLD, S.R., JONES, C.M. y CAMPANA, S.E. Response of otolith microchemistry to environmental variations experienced by larval and juvenile Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Limnology and Oceanography*, 1997, 42 (1), 102-111.
- [123] CAMPANA, S.E., CHOUINARD, G.A., HANSON, J.M., FRECHET, A. y BRATTEY, J. Otolith elemental fingerprints as biological tracers of fish stocks. *Fisheries Research*, 2000, 46 (1-3), 343-357.
- [124] CAMPANA, S.E. y THORROLD, S.R. Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2001, 58 (1), 30-38.
- [125] CAMPANA, S.E. Otolith science entering the 21st century. *Marine & Freshwater Research*, 2005, 56 (5), 485-495.
- [126] RANALDI, M.M. y GAGNON, M.M. Trace metal incorporation in otoliths of black bream (*Acanthopagrus butcheri* Munro), an indicator of exposure to metal contamination. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2008, 194 (1-4), 31-43.



- [127] REIBISCH, J. Ueber die Eizahl dei Pleuronectes platessa und die Altersbestimmung dieser Form aus den Otolithen. *Wissenschaft liche Meeresuntersuchungen/Abteilung Kiel Neue Folge*, 1899, (4) 231-248.
- [128] KALISH, J.M. Determinants of otolith chemistry: seasonal variation in the composition of blood plasma, endolymph and otoliths of bearded rock cod *Pseudophycis barbatus*. *Marine Ecology Progress Series*, 1991, 74 (2-3), 137-159.
- [129] BATH, G.E., THORROLD, S.R., JONES, C.M., CAMPANA, S.E., MCLAREN, J.W. y LAM, J.W.H. Strontium and barium uptake in aragonitic otoliths of marine fish. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, 64 (10), 1705-1714.
- [130] BROWN, R.J. y SEVERIN, K.P. Otolith chemistry analyses indicate that water Sr:Ca is the primary factor influencing otolith Sr:Ca for freshwater and diadromous fish but not for marine fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2009, 66 (10), 1790-1808.
- [131] GILLANDERS, B.M. Trace metals in four structures of fish and their use for estimates of stock structure. *Fishery Bulletin*, 2001, 99 (3), 410-419.
- [132] GEMPERLINE, P.J., RULIFSON, R.A. y PARAMORE, L. Multi-way analysis of trace elements in fish otoliths to track migratory patterns. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2002, 60 (1-2), 135-146.
- [133] HAMER, P.A., JENKINS, G.P. y GILLANDERS, B.M. Otolith chemistry of juvenile snapper *Pagrus auratus* in Victorian waters: Natural chemical tags and their temporal variation. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 263 261-273.
- [134] ZUMHOLZ, K., KLUEGEL, A., HANSTEEN, T. y PIATKOWSKI, U. Statolith microchemistry traces the environmental history of the boreoatlantic armhook squid *Gonatus fabricii*. *Marine Ecology: Progress Series*, 2007, 333 195-204.
- [135] CRC Reef Research Centre. Ear bones hold the key to fishy secrets [en línea]. CRC Reef Research Centre, [Consulta 21-02-2011]. Disponible en Web: <http://www.reef.crc.org.au/media/otolith.htm>
- [136] BELLOTTO, V.R. y MIEKELEY, N. Improvements in calibration procedures for the quantitative determination of trace elements in carbonate material (mussel shells) by laser ablation ICP-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 2000, 367 (7), 635-640.
- [137] OUTRIDGE, P.M., CHENERY, S.R., BABALUK, J.A. y REIST, J.D. Analysis of geological Sr isotope markers in fish otoliths with subannual resolution using laser ablation-multicollector-ICP-mass spectrometry. *Environmental Geology*, 2002, 42 (8), 891-899.
- [138] BROPHY, D., JEFFRIES, T.E. y DANILOWICZ, B.S. Elevated manganese concentrations at the cores of clupeid otoliths: Possible environmental, physiological, or structural origins. *Marine Biology*, 2004, 144 (4), 779-786.
- [139] STORELLI, M.M., GIACOMINELLI-STUFFLER, R., STORELLI, A. y MARCOTRIGIANO, G.O. Accumulation of mercury, cadmium, lead and arsenic in swordfish and bluefin tuna from the Mediterranean Sea: A comparative study. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 50 (9), 93-1018.

- [140] BAYLIFF, W.H., LEIVA MORENO, J.I. y MAJKOWSKI, J. Proceedings of the second meeting of the technical advisory committee of the FAO Project "Management of tuna fishing capacity: conservation and socio-economics". Madrid (Spain), 15-18 March 2004. Rome: FAO Fisheries Proceedings. No. 2, 2005. ISBN: 9251052972.
- [141] RUIZ, M., RODRÍGUEZ-MARÍN, E. y LANDA, J. Protocol for sampling of hard parts for bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) growth studies [en línea]. International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas (ICCAT), [Consulta 2010-10-13]. Disponible en Web: <http://www.iccat.int/Documents/SCRS/Other/BFT%20age%20sampling%20EN.pdf>
- [142] FOREMAN, T. Estimates of age and growth, and an assessment of ageing techniques, for Northern Bluefin Tuna, *Thunnus Thynnus*, in the Pacific Ocean. *Inter-American Tropical Tuna Commission Bulletin*, 1996, 21 (2), 71-129.
- [143] MEGALOFONOU, P. Age and growth of Mediterranean albacore. *Journal of Fish Biology*, 2000, 57 (3), 700-715.
- [144] MEGALOFONOU, P. y DE METRIO, G. Age estimation and annulus-formation in dorsal spines of juvenile bluefin tuna, *Thunnus thynnus*, from the Mediterranean Sea. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2000, 80 (4), 753-754.
- [145] SANTAMARIA, N., BELLO, G., CORRIERO, A., DEFLORIO, M., VASSALLO-AGIUS, R., BÖK, T. y DE METRIO, G. Age and growth of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Osteichthyes: Thunnidae), in the Mediterranean Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 2009, 25 (1), 38-45.
- [146] GONZALÉZ-GARCÉS, A. y FARIÑA-PEREZ, A.C. Determining the age of young albacore, *Thunnus alalunga*, using dorsal spines. In: *Proceedings of the International Workshop on Age determination of Oceanic Pelagic Fishes: Tunas, Billfishes and Sharks*. NOAA Technical Report 8. (ed. E.D. Prince & L.M. Pulos), p. 117-122 U.S. Dep. Comm., 1983.
- [147] COMPEÁN-JIMENEZ, G. y BARD, F.X. Growth increments on dorsal spines of eastern Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) and their possible relation to migrations patterns. In: *Proceedings of the International Workshop on Age Determination of Oceanic Pelagic Fishes: Tunas, Billfishes, and Sharks*. NOAA Technical Report 8 (ed. E.D. Prince & L.M. Pulos), Vol. 8,, p. 77-86 U.S. Dep. Comm., 1983.
- [148] DAVIES, C.A., BROPHY, D., JEFFRIES, T. y GOSLING, E. Trace elements in the otoliths and dorsal spines of albacore tuna (*Thunnus alalunga*, Bonnaterre, 1788): An assessment of the effectiveness of cleaning procedures at removing postmortem contamination. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2011, 396 (2), 162-170.
- [149] DOVE, S.G. y KINGSFORD, M.J. Use of otoliths and eye lenses for measuring trace-metal incorporation in fishes: A biogeographic study. *Marine Biology*, 1998, 130 (3), 377-387.
- [150] WELLS, B.K., THORROLD, S.R. y JONES, C.M. Geographic variation in trace element composition of juvenile weakfish scales. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2000, 129 (4), 889-900.
- [151] GHAZI, A.M., SHUTTLEWORTH, S., ANGULO, S.J. y PASHLEY, D.H. New applications for laser ablation high resolution ICPMS (LA-HR-ICP-MS): Quantitative measurements of gallium

diffusion across human root dentin. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2000, 15 (10), 1335-1341.

[152] URYU, T., YOSHINAGA, J., YANAGISAWA, Y., ENDO, M. y TAKAHASHI, J. Analysis of lead in tooth enamel by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical Sciences*, 2003, 19 (10), 1413-1416.

[153] BELLIS, D.J., HETTER, K.M., JONES, J., AMARASIRIWARDENA, D. y PARSONS, P.J. Calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for quantitative measurements of lead in bone. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2006, 21 (9), 948-954.

[154] STADLBAUER, C., REITER, C., PATZAK, B., STINGEDER, G. y PROHASKA, T. History of individuals of the 18th/19th centuries stored in bones, teeth, and hair analyzed by LA-ICP-MS--a step in attempts to confirm the authenticity of Mozart's skull. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 388 (3), 593-602.

[155] GRUHL, S., WITTE, F., VOGT, J. y VOGT, C. Determination of concentration gradients in bone tissue generated by a biologically degradable magnesium implant. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2009, 24 (2), 181-188.

[156] MATTINSON, J.M. Preparation of hydrofluoric, hydrochloric, and nitric acids at ultralow lead levels. *Analytical Chemistry*, 1972, 44 (9), 1715-1716.

[157] KUEHNER, E.C., ALVAREZ, R., PAULSEN, P.J. y MURPHY, T.J. Production and analysis of special high-purity acids purified by sub-boiling distillation. *Analytical Chemistry*, 1972, 44 (12), 2050-2056.

[158] COMPEÁN-JIMENEZ, G. Comparaison de techniques de détermination de l'âge chez les principales espèces de thonidés atlantiques [Tesis doctoral]. Marseille: Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, 1980.

[159] US-EPA. EPA Method 200.3: Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements in biological tissues. Cincinnati: US-EPA: Environmental Services Division, 1991.

[160] DAS, K., LEPOINT, G., LOIZEAU, V., DEBACKER, V., DAUBY, P. y BOUQUEGNEAU, J.M. Tuna and Dolphin Associations in the North-east Atlantic: Evidence of Different Ecological Niches from Stable Isotope and Heavy Metal Measurements. *Marine Pollution Bulletin*, 2000, 40 (2), 102-109.

[161] YILMAZ, F., ÖZDEMİR, N., DEMIRAK, A. y TUNA, A.L. Heavy metal levels in two fish species *Leuciscus cephalus* and *Lepomis gibbosus*. *Food Chemistry*, 2007, 100 (2), 830-835.

[162] TÜRKMEN, M. y CIMINLI, C. Determination of metals in fish and mussel species by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Food Chemistry*, 2007, 103 (2), 670-675.

[163] MANUTSEWEE, N., AEUNGMAITREPIROM, W., VARANUSUPAKUL, P. y IMYIM, A. Determination of Cd, Cu, and Zn in fish and mussel by AAS after ultrasound-assisted acid leaching extraction. *Food Chemistry*, 2007, 101 (2), 817-824.

[164] KAZI, T.G., JAMALI, M.K., ARAIN, M.B., AFRIDI, H.I., JALBANI, N., SARFRAZ, R.A. y ANSARI, R. Evaluation of an ultrasonic acid digestion procedure for total heavy metals

determination in environmental and biological samples. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 161 (2-3), 1391-1398.

[165] SÁNCHEZ LÓPEZ, F.J., GIL GARCÍA, M.D., SÁNCHEZ MORITO, N.P. y MARTÍNEZ VIDAL, J.L. Determination of heavy metals in crayfish by ICP-MS with a microwave-assisted digestion treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 54 (2), 223-228.

[166] BURGER, J. y GOCHFELD, M. Heavy metals in commercial fish in New Jersey. *Environmental Research*, 2005, 99 (3), 403-412.

[167] VISNJIC-JEFTIC, Z., JARIC, I., JOVANOVIC, L., SKORIC, S., SMEDEREVAC-LALIC, M., NIKCEVIC, M. y LENHARDT, M. Heavy metal and trace element accumulation in muscle, liver and gills of the Pontic shad (*Alosa immaculata* Bennet 1835) from the Danube River (Serbia). *Microchemical Journal*, 2010, 95 (2), 341-344.

[168] CANEPARI, S., CARDARELLI, E., GHIGHI, S. y SCIMONELLI, L. Ultrasound and microwave-assisted extraction of metals from sediment: a comparison with the BCR procedure. *Talanta*, 2005, 66 (5), 1122-1130.

[169] DOVE, S.G., GILLANDERS, B.M. y KINGSFORD, M.J. An investigation of chronological differences in the deposition of trace metals in the otoliths of two temperate reef fishes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1996, 205 (1-2), 15-33.

[170] STANISKIENE, B., MATUSEVICIUS, P., BUDRECKIENE, R. y SKIBNIEWSKA, K.A. Distribution of heavy metals in tissues of freshwater fish in Lithuania. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2006, 15 (4), 585-591.

[171] ARSLAN, Z. y SECOR, D.H. High resolution micromill sampling for analysis of fish otoliths by ICP-MS: Effects of sampling and specimen preparation on trace element fingerprints. *Marine Environmental Research*, 2008, 66 (3), 364-371.

[172] RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P., MARCHANTE-GAYÓN, J.M., GARCÍA ALONSO, J.I. y SANZ-MEDEL, A. Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy*, 2005, 60B (2), 151-207.

[173] 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. *Analytica Chimica Acta*, 1995, 312 (1), 57-78.

[174] HOELZL, R., HOELZL, C., KOTZ, L. y FABRY, L. The optimal amount of isotopic spike solution for ultratrace analysis by isotope dilution mass spectrometry. *Accreditation and Quality Assurance*, 1998, 3 (5), 185-188.

[175] EUROPEAN COMMISSION. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No SANCO/10684/2009. 2010.

[176] ZAICHICK, V., ZAICHICK, S., KARANDASHEV, V. y NOSENKO, S. The effect of age and gender on Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, P, S, Sr, V, and Zn contents in rib bone of healthy humans. *Biological Trace Element Research*, 2009, 129 (1-3), 107-115.

- [177] DOLAN, S.P., NORTRUP, D.A., BOLGER, P.M. y CAPAR, S.G. Analysis of dietary supplements for arsenic, cadmium, mercury, and lead using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51 (5), 1307-1312.
- [178] FAO. Compilation of legal limits for hazardous substances in fish and fishery products. FAO fishery circular N° 464. 1983.
- [179] US-EPA. Methods for chemical analysis of water and waste. EPA-600/4-79-020. Cincinnati: US-EPA: Environmental Services Division, 1983.
- [180] COMISIÓN EUROPEA. Reglamento (CE) No 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 10 de diciembre de 2006, L 364/5.
- [181] COMISIÓN EUROPEA. Reglamento (CE) No 629/2008 de la Comisión de 2 de julio de 2008 que modifica el Reglamento (CE) No 1881/2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 3 de julio de 2008, L 173/6.
- [182] EUROPEAN COMMISSION. Information Note: Methyl mercury in fish and fishery products. Brussels: European Commission, Health&Consumer Protection Directorate-General, 2004.
- [183] HELLOU, J., FANCEY, L.L. y PAYNE, J.F. Concentrations of twenty-four elements in bluefin tuna, *Thunnus thynnus* from the Northwest Atlantic. *Chemosphere*, 1992, 24 (2), 211-218.
- [184] O'CONNOR, C., SHARP, B.L. y EVANS, P. On-line additions of aqueous standards for calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: Theory and comparison of wet and dry plasma conditions. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2006, 21 (6), 556-565.
- [185] BOULYGA, S.F., PICKHARDT, C. y BECKER, J.S. New approach of solution-based calibration in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry of trace elements in metals and reduction of fractionation effects. *Atomic Spectroscopy*, 2004, 25 (2), 53-63.
- [186] FDA Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. USA: US-FDA, 2001.
- [187] Jochum, K. P. y Nehring, F. GeoReM, NISTSRM 612 GeoReM preferred values [en línea]. [Consulta 2010-12- 2]. Disponible en Web: <http://georem.mpch-mainz.gwdg.de>
- [188] TANG, S., PARSONS, P.J. y SLAVIN, W. Rapid and reliable method for the determination of aluminium in bone by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 1996, 121 (2), 195-200.



## Contribuciones de la Tesis

---







---

## Contribuciones de la Tesis

---

### Artículos:

- A. Ugarte, N. Unceta, M.C. Sampedro, M.A. Goicolea, A. Gómez-Caballero, R.J. Barrio. *"Solid phase microextraction coupled to liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of organotin compounds in water samples"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 24 (3) (2009) 347-351.
- A. Ugarte, N. Unceta, .C. Sampedro, M.A. Goicolea, A. Gómez-Caballero, R.J. Barrio. *"New hyphenated instrumental combination for speciation: solid phase microextraction coupled to HPLC-ICP-MS"*. 2nd Edition of the Agilent Handbook of Hyphenated ICP-MS Applications (To be published next June, 2011). (Accepted)
- A. Ugarte, N. Unceta, C. Pécheyran, M.A. Goicolea, R.J. Barrio. *"Development of matrix-matching hydroxyapatite calibration standards for quantitative multi-element LA-ICP-MS analysis: application to dorsal spine of fish"*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, (2011), DOI: 10.1039/c1ja10037h.
- A. Ugarte, Z. Abrego, N. Unceta, M.A. Goicolea, R.J. Barrio. *"Evaluation of the bioaccumulation of trace elements in tuna species by correlation analysis between their concentrations in muscle and first dorsal spine using microwave assisted digestion and ICP-MS"*. Accepted in International Journal of Environmental Analytical Chemistry.

**Comunicaciones a congresos:**

- 2011 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry (30 enero-4 febrero 2011, Zaragoza, España) "*Development of matrix-matching calibration standards for quantitative multi-element LA-ICP-MS analysis of fishbone*". A. Ugarte, N. Unceta, C. Pécheyran, M.A. Goicolea, R.J. Barrio. Póster.
- I Workshop Nacional en Ablación Láser ICP-MS (18-19 noviembre 2010, Oviedo) "*Determinación de elementos traza en la primera espina dorsal de túnidos por Ablación Láser acoplada a ICP-MS*". A. Ugarte, N. Unceta, C. Pécheyran, M.A. Goicolea, R.J. Barrio. Comunicación oral. (Premio a la mejor comunicación oral)
- 10<sup>th</sup> European Workshop on Laser Ablation (29 junio-1 julio 2010, Kiel, Alemania) "*Determination of trace elements in the first dorsal fin of bluefin tuna (Thunnus thynnus)*". A. Ugarte, N. Unceta, C. Pécheyran, A. Sánchez-Ortega, M.A. Goicolea, R.J. Barrio. Póster.
- European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry 2009 (15-20 febrero 2009, Graz, Austria) "*New hyphenated technique for speciation: solid phase microextraction coupled to liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry*". A. Ugarte, N. Unceta, M.A. Goicolea, R.J. Barrio. Póster.

# Solid phase microextraction coupled to liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of organotin compounds in water samples†

Ana Ugarte, Nora Unceta, M. Carmen Sampedro, M. Aránzazu Goicolea, Alberto Gómez-Caballero and Ramón J. Barrio\*

Received 26th June 2008, Accepted 14th November 2008

First published as an Advance Article on the web 5th December 2008

DOI: 10.1039/b810786f

Solid-phase microextraction (SPME) coupled to high performance liquid chromatography (HPLC) and the subsequent detection by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) was used as a new approach for the determination of tributyltin (TBT), triphenyltin (TPhT), trimethyltin (TMeT) and tripropyltin (TPrT) in water samples. These organometallic compounds were extracted on a coated fiber and desorbed in static mode in a SPME/HPLC interface. Triorganotin compounds were separated using a mobile phase of water–acetonitrile–acetic acid (50 : 40 : 10) at a flow-rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>. In order to reduce the solvent loading on the plasma, the spray chamber was cooled to -5 °C and oxygen (0.1 L min<sup>-1</sup>) was mixed into the make-up gas by a mass-flow controller. The extraction and preconcentration capabilities of SPME and the monitorization of <sup>120</sup>Sn isotope signal by ICP-MS during the run provided detection limits ranging between 6 and 185 ng L<sup>-1</sup> Sn as well as good repeatability (inter-day RSD < 19.23%). This method was applied to the determination of triorganotins in freshwaters and seawater of leisure ports, which demonstrates the usefulness of this technique for organotins.

## Introduction

Organotin (OT) compounds are found in pesticides and other agricultural chemicals, wood preservatives and marine anti-fouling paints because of their biocidal and fungicidal properties. It is known that the organic species of tin are more toxic than the inorganic forms, with trisubstituted species being the most toxic organotins followed by disubstituted and monosubstituted ones.<sup>1,2</sup> Tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPhT), which have a tendency to accumulate in sediments and organisms, are the most toxic OT and could promote harmful effects on non-target aquatic organisms such as shell thickening and span failure in oysters, imposex and retardation of growth in mussels and immunological dysfunction in fish.<sup>3–5</sup> Organotins have been regarded as priority pollutants by the European Union both in the Pollutant Emission Register (2000/479/EC) and in the Water Framework Directive (2000/60/EC). Therefore, the analysis and monitoring of OT in environmental samples are extremely important.

Monitoring elemental species requires selective and sensitive analytical methods to resolve and quantify the different species at very low levels. Several spectroscopic techniques have already been employed to determine organotins such as hydride generation-ETAAS (HG-ETAAS)<sup>6</sup> or inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES).<sup>7,8</sup> Although gas

chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS)<sup>9,10</sup> and inductively coupled plasma-mass spectrometry (GC-ICP-MS)<sup>11,12</sup> has high resolution power and sensitivity, the derivatization is time-consuming and may alter speciation.<sup>2</sup> Organotin separations by high-performance liquid chromatography (HPLC) offer the advantage that derivatization is not required, which eliminates a potential source of uncertainty in the final result and can reduce analysis time significantly. For HPLC the detectors have typically been fluorescence,<sup>13</sup> ultraviolet,<sup>14,15</sup> atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry (APCI-MS)<sup>16,17</sup> and electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS).<sup>18,19</sup> Nowadays, one of the most promising technologies for organometallic speciation is HPLC coupled to ICP-MS.<sup>20,21</sup> ICP-MS offers excellent sensitivity, wide linear dynamic range, high-speed analysis and the ability to perform isotopic analysis.<sup>22</sup> The coupling of LC with ICP-MS is simple, basically because the flow-rates commonly used with HPLC are compatible to conventional liquid-sample-introduction systems. Therefore, the outlet of the HPLC column is directly connected to the ICP-MS nebulizer.

Solid-phase microextraction (SPME), due to its simple, fast and solvent-less features, has received growing interest in speciation analysis.<sup>23</sup> SPME allows the simultaneous extraction and preconcentration of analytes from a sample matrix which is directly exposed to the samples or to the headspace. Based on our own survey of the literature, the organotins have been extracted by SPME from freshwater, wastewater, sediments, soils and also from mussels<sup>24–27</sup> followed, in most cases, by GC detection. In SPME-GC analysis, thermal desorption at high temperatures creates problems since many non-volatile compounds cannot be

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country, UPV/EHU, Paseo de la Universidad 7, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain. Fax: +34 945014351; Tel: +34 945013055

† Electronic supplementary information (ESI) available: Fig. S1–S3. See DOI: 10.1039/b810786f

completely desorbed from the fiber. Therefore, these compounds need to be derivatized before GC separation in order to increase their volatility.<sup>28</sup> Fewer papers describe SPME based extraction of organotins with LC analysis. Wu *et al.*<sup>29</sup> employed in-tube SPME combined with LC electrospray mass spectrometry for the sampling and determination of TBT. Another approach is the direct introduction SPME, without chromatographic separation; Mester *et al.*<sup>30</sup> used halide generation SPME with ICP-TOF-MS detection for determination of TBT using a heated sample introduction port. As an alternative, a new method based on the hyphenation of SPME with HPLC/ICP-MS is proposed, a hyphenation that, to date, has never been proposed.

In the present study the optimization of a SPME/HPLC/ICP-MS method for the extraction, separation and quantification of trisubstituted organotin compounds is discussed and the validation parameters are presented.

## Experimental

### Reagents, standards and samples

Trimethyltin chloride (98.5%), tripropyltin chloride (97%), triphenyltin hydroxide (96%) and tributyltin chloride (96.5%) were purchased from Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburg, Germany). HPLC grade acetonitrile and methanol, and sodium chloride (extra pure) were obtained from Scharlab (Barcelona, Spain). Glacial acetic acid (Suprapur) and sodium acetate (99% purity) were from Merck (Darmstadt, Germany). LC-grade water was prepared by purifying demineralized water in a Milli-Q water filtration system (Millipore, Milford, MA, USA).

Stock standard solutions were prepared in methanol to contain 1 mg mL<sup>-1</sup> of each compound and they were preserved at -42 °C in a freezer. Further dilutions down to 1 mg L<sup>-1</sup> were also carried out with methanol and stored at 4 °C. Working standard solutions were prepared by diluting the appropriate volume of the 1 mg L<sup>-1</sup> reference solution up to 10 mL with water.

Freshwater samples were collected from a leisure port in Ullibarri-Ganboa reservoir (Alava, Spain) and seawater samples were collected from Bermeo seaport (Vizcaya, Spain). All of these were filtered through 0.45 µm membrane filters (Scharlab, Barcelona, Spain) and stored in darkness at -42 °C until analysis.

### Instrumentation

The SPME/HPLC interface, a holder assembly and several commercially available polymeric fibers were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The interface consisted of a standard six-port Rheodyne valve equipped with a fiber desorption chamber (total volume: 60 µL), installed in place of the sample loop. In order to select the most suitable fiber, four different fiber types were compared: polydimethylsiloxane 100 µm, polyacrylate 85 µm (PA), polydimethylsiloxane/divinylbenzene 60 µm (PDMS/DVB) and carbowax/templated resin 50 µm (CW/TPR). Each day before sample analysis, in order to ensure good selectivity and sensitivity results, the fiber was conditioned with mobile phase for approximately 20 min. Then the fiber was washed in water with magnetic stirring for 4 min. After conditioning, the fiber could be used for extraction. 4 mL screw-cap vials supplied with a PTFE-lined septum (Kimble Glass,

Vineland, NJ, USA), a 0.8 cm stir bar and a magnetic stirrer (IKA, Staufen, Germany) were used for magnetic stirring.

A 7500ce Series ICP-MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used in this work for time-resolved analysis of the compounds. A MicroMist micro-uptake glass concentric nebulizer (Glass Expansion, West Melbourne, Victoria, Australia) was used to create the aerosol prior to introduction into the plasma. The use of mobile phases containing organic solvents may form carbon deposits and consequently clog the nebulizer and the sampler and skimmer cones, which could contribute to higher noise and reduce signal. Besides, this is also harmful for plasma stability and may even extinguish plasma.<sup>31</sup> In order to reduce the solvent loading on the plasma, the spray chamber was Peltier cooled to -5 °C and oxygen (0.1 L min<sup>-1</sup>) was mixed into the make-up gas by a mass-flow controller and added post-nebulization to convert organic carbon to CO<sub>2</sub> in the plasma and avoid carbon build-up on the cones. Typical ICP-MS operating conditions are given in Table 1. Prior to HPLC analysis, the optimization of the ICP-MS conditions was achieved by adjusting the torch position and tuning for reduced oxide and doubly charged ion formation with a standard tuning solution containing <sup>7</sup>Li, <sup>24</sup>Mg, <sup>59</sup>Co, <sup>89</sup>Y, <sup>140</sup>Ce and <sup>205</sup>Tl in 2% HNO<sub>3</sub>. Since there is no isobaric interference for <sup>120</sup>Sn, the most abundant isotope, detection of organotins by ICP-MS was performed at *m/z* 120.

The HPLC system consisted of a 1100 binary pump (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) fitted with a Rheodyne injection valve and a 10 µL sample loop. A Mediterranean Sea18 (Teknokroma, Barcelona, Spain) C18 reversed phase column of 100 × 2.1 mm id and filled with 3 µm particles was used for chromatographic separation. Mobile phase consisted of a mixture of water-acetonitrile-acetic acid (50 : 40 : 10) at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>. All separations were performed at room temperature under isocratic conditions. <sup>103</sup>Rh was added to the mobile phase in order to do a final optimization of ICP-MS conditions once the HPLC system was coupled to the nebulizer.

**Table 1** ICP-MS operating conditions for HPLC analysis

Interface cones	Platinum
Plasma gas flow	15 L min <sup>-1</sup>
Carrier gas flow	0.85–0.90 L min <sup>-1</sup>
Make-up gas flow	0.10–0.12 L min <sup>-1</sup>
RF power	1550 W
Sampling depth	8.0–10.0 mm
Ion lens setting parameters:	
Extraction lens 1	2 V
Extraction lens 2	-140 V
Omega bias	-30 V
Omega lens	1 V
Cell input	-34 V
QP Focus	2 V
Cell output	-30 V
Octopole RF	150 V
Octopole bias	-6 V
QP bias	-3 V
Integration time per mass	300 ms
Isotopes monitored	<sup>103</sup> Rh, <sup>118</sup> Sn, <sup>120</sup> Sn
Other parameters	ICP torch injector diameter: 1.5 mm Double-pass Scott-type spray chamber

All stainless-steel parts of the HPLC system that came into contact with the sample were replaced by polyether ether ketone (PEEK) components. The HPLC/ICP-MS interface consisted of a short length (22 cm) of PTFE tubing (0.25 mm id) that connected the end of the column to the nebulizer. It is very important to keep the connecting tubing short to minimize the dead volume and subsequent peak broadening and loss of reproducibility.

### SPME procedure

Direct immersion (DI) extraction was carried out as follows: an aliquot of 3 mL of standard solutions or sample containing 75 g L<sup>-1</sup> of NaCl was put in a 4 mL screw-cap vial. The fiber was immersed in the solution for the selected time period at ambient temperature (21 ± 1 °C). Before and during the extraction the solution was vigorously stirred at a constant speed with a magnetic stir bar.

After sample extraction, the SPME fiber was withdrawn into the needle, removed from the septum and introduced into the desorption chamber full of mobile phase. In order to desorb the analytes by static mode, the fiber was soaked in the chamber for 5 min. Then, the valve was changed to the inject position and the fiber was exposed to the mobile phase stream for 1 min. Since the method required the introduction of the fiber in organic solvents and salts, the fiber was cleaned with water for 4 min prior to starting the next extraction.

## Results and discussion

### Separation of OTs by HPLC

In order to get the best resolution in the shorter analysis time, several stationary phases and column dimensions as well as different mobile phase compositions with attention to the organic modifier (methanol and acetonitrile), ion-pairing reagent, pH and flow were tested. The best results were obtained using: Mediterranean Sea18 column (100 × 2.1 mm, 3 μm) (Teknokroma, Barcelona, Spain), water–acetonitrile–acetic acid (50 : 40 : 10), pH = 2, without ion-pairing reagent as a mobile phase, at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>. With these conditions the chromatographic separation was achieved in 12 min with good resolution.

The used column required a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>, which does not pose a problem because the inherent ion transmission of the ICP-MS means that even low sample flow rates can be used without compromising sensitivity but reducing solvent loading on the plasma. Besides, this flow fits well with the optimum aspiration level of the MicroMist nebulizer (between 0.3 and 0.6 mL min<sup>-1</sup>).

### SPME optimization

In order to develop a SPME procedure for extraction and concentration of the analytes from water samples, a step-by-step optimization study of the main parameters influencing the SPME process was carried out analyzing 3 mL of standard solutions containing 5 μg L<sup>-1</sup> of each analyte (as Sn) in water.

The results from the studies of four commercially available fiber assemblies showed that PDMS/DVB fiber gave the best extraction efficiency for TMeT, TPrT and TPhT, while the most

polar CW/TPR exhibited slightly better extraction for TBT. As a compromise between different extraction efficiencies, PDMS/DVB was chosen for further experiments.

The efficiency of analyte extraction can vary widely upon the matrix influence, the control of salt concentration and sample pH,<sup>32</sup> the appropriate time period for the extraction<sup>33</sup> and the temperature of absorption. The effect of salt addition, pH, extraction time and temperature were studied. The results obtained are shown in Fig. S1, S2 and S3 (see ESI†). pH above 7 bring about a decrease in extraction, while with pH under 6 no significant changes were observed in the amount extracted. The extraction process was carried out adding 75 g L<sup>-1</sup> of NaCl to samples, for 45 min, at sample pH (6.5) and at room temperature.

Two modes of desorption, dynamic and static mode, were evaluated for PDMS/DVB fiber. Best recoveries were reached in static mode, by soaking the fiber in mobile phase inside the desorption chamber of the interface for 5 min. Finally, the valve was changed to the inject position and the fiber was exposed for 1 min to the mobile phase stream. At this desorption and injection time there was no evidence of carry-over and the preservation of chromatographic efficiency was ensured. The preconcentration factors, *p* (the ratio of the peak areas obtained with SPME and that with direct injection), depend on the analyte. At a concentration level of 10 μg L<sup>-1</sup> these values were: *p*<sub>TMeT</sub> = 9.5, *p*<sub>TPrT</sub> = 32.2, *p*<sub>TPhT</sub> = 23.8 and *p*<sub>TBT</sub> = 11.7.

### Analytical assessment of the method

The analytical performance of the developed SPME/HPLC/ICP-MS methodology was evaluated in terms of linearity, precision and detection and quantification limits.

The linearity of the proposed method was tested using standard solutions with increasing concentrations of TMeT, TPrT, TPhT and TBT varying from quantification limit to 20 μg L<sup>-1</sup>. The calibration curves (peak area vs. concentration) showed a linear response over the complete range with correlation coefficients (*R*<sup>2</sup>) ranging from 0.990 to 0.999.

In order to check the precision of the whole optimised procedure, standards containing 1 and 5 μg L<sup>-1</sup> of the analytes (as Sn) were analysed. The intra-day relative standard deviations (RSD) of peak areas of the assays were performed for ten consecutive extractions at these two levels of concentration.

The same standards were analyzed at intervals over a 2-week period (*n* = 10). The results enabled RSD estimation of the method for each compound. As shown in Table 2, the RSD values were below 13.66% and 19.23% for intra- and inter-day precision respectively.

Table 2 also shows the detection and quantification limits calculated according to the IUPAC Guidelines (three and ten times, respectively, the standard deviation of the background divided by the slope of the calibration curve). Limits of quantification are also given determined according to the European Union Guidelines<sup>34</sup> as the lowest concentration on the calibration curve in which the coefficient of the variation was lower than 20%. Not surprisingly, different analytes have different extraction efficiencies under compromise conditions, so their LODs exhibit some divergences.

**Table 2** Limits of detection and quantification and intra-/inter-day relative standard deviations at two different levels of concentrations of SPME/HPLC/ICP-MS determinations (as Sn)

Analyte	LOD <sup>a</sup> /ng L <sup>-1</sup>	LOQ <sup>b</sup> /ng L <sup>-1</sup>	LOQ <sup>c</sup> /ng L <sup>-1</sup>	Intra-day RSD (% , n = 10)		Inter-day RSD (% , n = 10)	
				1 µg L <sup>-1</sup>	5 µg L <sup>-1</sup>	1 µg L <sup>-1</sup>	5 µg L <sup>-1</sup>
TMeT	135	451	500	3.18	7.18	7.73	4.47
TPrT	6	19	300	13.03	5.40	18.20	16.07
TPhT	11	38	500	13.66	3.54	19.23	16.94
TBT	185	616	1000	13.65	10.91	14.71	3.25

<sup>a</sup> LOD: Detection limits calculated following IUPAC Guidelines: three times standard deviation of the background divided by the slope of the calibration curve. <sup>b</sup> LOQ: Quantification limits calculated following IUPAC Guidelines: ten times standard deviation of the background divided by the slope of the calibration curve. <sup>c</sup> LOQ: Quantification limits calculated as the lowest concentration on the calibration curve in which the coefficient of the variation was lower than 20%.

On the other hand, the proposed method does not present interferences because other alkyltins have different retention times and inorganic tin is not extracted by SPME fiber.

In order to investigate the applicability of the proposed method, five natural freshwater samples from a leisure port on Ullibarri-Ganboa reservoir (Alava, Spain) were studied. No interferences were detected in the analyzed samples and only one of them contained 1.01 µg L<sup>-1</sup> of TMeT.

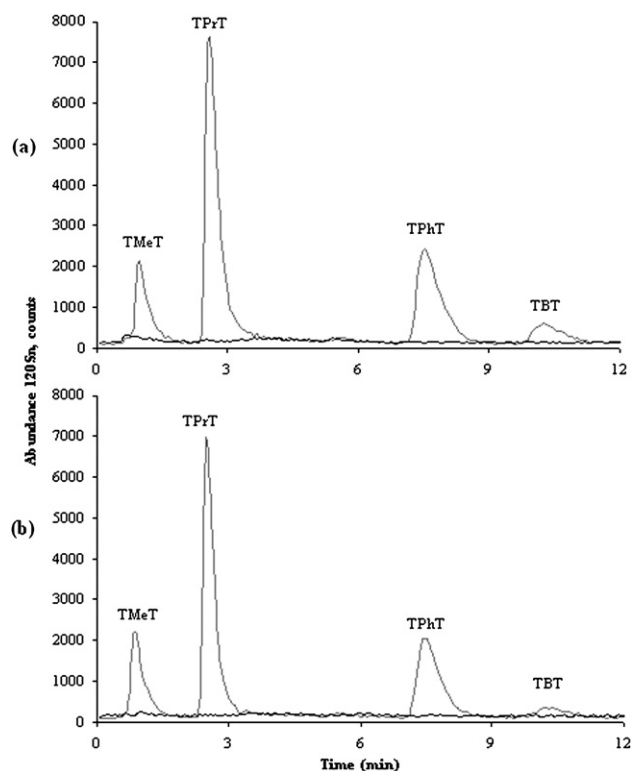
The applicability of the method to seawater samples was also studied. Due to the salt concentration of seawater, the extraction of the analytes could be modified. Therefore, taking into account that the salt concentration in seawater in our latitudes is estimated to be 35 g L<sup>-1</sup>, the salt addition to seawater samples was adjusted in order to get the optimum concentration (75 g L<sup>-1</sup>). This way, five seawater samples from a seaport (Bermeo, Vizcaya, Spain) were analyzed, but none of the analytes or interferences were detected.

In order to evaluate the accuracy of the developed method, both freshwater and seawater samples were used for spiking experiments. The recoveries were studied spiking the samples with a standard mixture of the organotins at a concentration level of 3 µg L<sup>-1</sup> (as Sn) of each analyte. The results obtained were compared with those obtained by similar analysis of the standard solution made up in Milli-Q water. Recoveries ranged from 71 to 104%, with standard deviations of less than 19% (Table 3). Typical SPME/HPLC/ICP-MS chromatograms of spiked freshwater and seawater samples are shown in Fig. 1a and 1b respectively.

The analytical performances of the developed method are comparable to those obtained using direct injection HPLC-ICP-MS,<sup>35-37</sup> with the added inherent advantages of the SPME,

**Table 3** Mean recoveries of organotin compounds from spiked freshwater and seawater samples by SPME/HPLC/ICP-MS. Spiking level: 3 µg L<sup>-1</sup> (as Sn)

Analyte	Recovery (% , n = 3) (mean ± SD)	
	Freshwater	Seawater
TMeT	104 ± 9	78 ± 10
TPrT	99 ± 15	96 ± 11
TPhT	100 ± 19	71 ± 13
TBT	80 ± 9	85 ± 8

**Fig. 1** SPME/HPLC/ICP-MS chromatograms of: (a) freshwater sample (b) seawater sample. Thick line: unspiked samples, thin line: sample spiked with 3 µg L<sup>-1</sup> of the analytes (as Sn).

a simple, rapid and solventless technique which does not require any preliminary sample preparation step.

## Conclusions

The development of this method has proved that the hyphenation of the SPME to HPLC/ICP-MS, never previously carried out, is feasible and could be successfully used. The optimized method based on this coupling offers an attractive new approach for the quantification of TMeT, TPrT, TPhT and TBT in both freshwater and sea water samples. It is confirmed that direct immersion SPME is an effective solventless technique for the extraction/preconcentration of the selected organotins. The

developed method is easy-to-use, reproducible and accurate for tin speciation without complicated sample pre-treatment.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the Central Service of Analysis of the University of the Basque Country (SGiker) for its excellent technical assistance and the Research Office of UPV/EHU for the pre-doctoral grant of A. Ugarte.

## References

- 1 J. Kuballa, R.-D. Wilken, E. Jantzen, K. K. Kwan and Y. K. Chau, *Analyst*, 1995, **120**, 667–673.
- 2 C. Rivas, L. Ebdon, E. H. Evans and S. J. Hill, *Appl. Organomet. Chem.*, 1996, **10**, 61–68.
- 3 K. Mochida, K. Ito, K. Kono, T. Onduka, A. Kakuno and K. Fujii, *Aquat. Toxicol.*, 2007, **83**, 73–83.
- 4 T. C. Hung, W. K. Hsu, P. J. Mang and A. Chuang, *Environ. Pollut.*, 2001, **112**, 145–152.
- 5 K. Fent, *Crit. Rev. Toxicol.*, 1996, **26**, 1–117.
- 6 M. Grotti, P. Rivaro and R. Frache, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 270–274.
- 7 P. Rivaro, L. Zaratini, R. Frache and A. Mazzucotelli, *Analyst*, 1995, **120**, 1937–1939.
- 8 H. Suyani, J. Creed, T. Davidson and J. Caruso, *Journal Chromatogr. Sci.*, 1989, **27**, 139–143.
- 9 D. Point, W. C. Davis, S. J. Christopher, M. B. Ellisor, R. S. Pugh, P. R. Becker, O. F. X. Donard, B. J. Porter and S. A. Wise, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **387**, 2343–2355.
- 10 C. Devosa, M. Vliegen, B. Willaert, F. David, L. Moens and P. Sandra, *J. Chromatogr., A*, 2005, **1079**, 408–414.
- 11 R. Kurihara, R. B. Rajendran, H. Tao, I. Yamamoto and S. Hashimoto, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2007, **26**, 647–654.
- 12 P. Pinel-Raffaitin, P. Rodriguez-Gonzalez, M. Ponthieu, D. Amouroux, I. Le Hecho, L. Mazeas, O. F. X. Donard and M. Potin-Gautier, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 258–266.
- 13 L. Ebdon, S. J. Hill and C. Rivas, *Trends Anal. Chem.*, 1998, **17**, 277–288.
- 14 X. Wang, L. Ding, H. Zhang, J. Cheng, A. Yu, H. Zhang, L. Liu, Z. Liu and Y. Li, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2006, **843**, 268–274.
- 15 S. C. Shum, R. Neddersen and R. S. Houk, *Analyst*, 1992, **117**, 577–582.
- 16 G. O'Connor, R. Wahlen, B. Fairman and K. S. Webb, *Adv. Mass Spectrom.*, 2001, **15**, 965–966.
- 17 E. Rosenberg, V. Kmetov and M. Grasserbauer, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2000, **366**, 400–407.
- 18 R. Jirasko, M. Holcapek, L. Kolarova and T. S. B. Baul, *J. Mass Spectrom.*, 2007, **42**, 918–928.
- 19 M. Holcapek, L. Kolarova, A. Ruazicka, R. Jambor and P. Jandera, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 4210–4218.
- 20 E. Gonzalez-Toledo, R. Compano, M. Granados and M. Dolores Prat, *Trends Anal. Chem.*, 2003, **22**, 26–33.
- 21 R. Wahlen and T. Catterick, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2003, **783**, 221–229.
- 22 K. L. Sutton and J. A. Caruso, *J. Chromatogr., A*, 1999, **856**, 243–258.
- 23 M. Crnoja, C. Haberhauer-Troyer, E. Rosenberg and M. Grasserbauer, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 1160–1166.
- 24 F. Bianchi, M. Careri, M. Maffini, A. Mangia and C. Mucchino, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 970–973.
- 25 T. Zuliani, G. Lespes, R. Milacic, J. Scancar and M. Potin-Gautier, *J. Chromatogr., A*, 2006, **1132**, 234–240.
- 26 C.-C. Chou and M.-R. Lee, *J. Chromatogr., A*, 2005, **1064**, 1–8.
- 27 C. Devos, M. Vliegen, B. Willaert, F. David, L. Moens and P. Sandra, *J. Chromatogr., A*, 2005, **1079**, 408–414.
- 28 D. A. Lambropoulou, I. K. Konstantinou and T. A. Albanis, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1152**, 70–96.
- 29 J. Wu, Z. Mester and J. Pawliszyn, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 159–165.
- 30 Z. Mester, R. E. Sturgeon, J. W. Lam, P. S. Maxwell and L. Peter, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, **16**, 1313–1316.
- 31 E. Gonzalez-Toledo, R. Compano, M. Granados and M. Dolores Prat, *Trends Anal. Chem.*, 2003, **22**, 26–33.
- 32 H. Lord and J. Pawliszyn, *J. Chromatogr., A*, 2000, **885**, 153–193.
- 33 M. C. Sampedro, O. Martin, C. Lopez de Armentia, M. A. Goicolea, E. Rodriguez, Z. Gomez de Balugera, J. Costa-Moreira and R. J. Barrio, *J. Chromatogr., A*, 2000, **893**, 347–358.
- 34 SANCO/2007/3131, *Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*, European Union Guidelines, European Commission, Brussels, 2007.
- 35 R. Wahlen and C. Wolff-Briche, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **377**, 140–148.
- 36 S. Chiron, S. Roy, R. Cottier and R. Jeannot, *J. Chromatogr., A*, 2000, **879**, 137–145.
- 37 W.-S. Chao and S.-J. Jiang, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 1337–1341.





# New hyphenated instrumental combination for speciation: Solid phase microextraction coupled to HPLC–ICP-MS

Ana Ugarte, Nora Unceta, M. Carmen Sampedro, M. Aránzazu Goicolea, Alberto Gómez-Caballero and Ramón J. Barrio

University of the Basque Country, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Vitoria-Gasteiz, Spain

## Introduction

Solid phase microextraction (SPME), due to its simple, fast and solvent-less features, has received growing interest in speciation analysis. SPME allows the simultaneous extraction and preconcentration of analytes directly from the sample matrix or from the headspace. Nowadays, one of the most common instrumental combination for organometallic speciation analysis consists on the coupling of an adequate chromatographic separation followed by ICP-MS detection, which offers excellent sensitivity, wide linear dynamic range, high speed analysis and the ability to perform isotopic analysis. To date, in most cases SPME has been coupled to ICP-MS after gas chromatographic separation. Few papers describe SPME based extraction of organometallic compounds with liquid chromatography and ICP-MS; these approaches use electro-synthesized organic conducting polymers as SPME elements to preconcentrate the analytes, with conventional injection to the LC system, without an on-line coupling. As an alternative, a new hyphenated technique based on the coupling of SPME on-line with HPLC/ICP-MS is proposed.

A SPME/HPLC/ICP-MS method for the extraction, separation and quantification of trisubstituted organotin compounds (tributyltin -TBT-, triphenyltin -TPhT-, trimethyltin -TMeT- and tripropyltin -TPrT-) in water samples is presented. Organotins have been regarded as priority pollutants by the European Union both in the Pollutant Emission Register (2000/479/EC) and in the Water Framework Directive (2000/60/EC), being the trisubstituted species the most toxic organotins.

## Experimental

The coupling of SPME on-line with HPLC and ICP-MS as a detector is direct and straightforward; the connection consists on the replacement of the manual injector by the commercial SPME interface (Supelco), just connecting the mobile phase outlet from the pump to the SPME interface, and this to the entrance of the chromatographic column. However, some considerations must be taken into account:

1. The volume of the fiber desorption chamber of the SPME interface (60  $\mu$ L) should be compatible for injection on the used chromatographic column.
2. The chromatographic column should be also compatible with the flow of the employed ICP-MS nebulizer. It is also important to keep the connecting tubing between the HPLC and the ICP-MS short to minimize the dead volume and subsequent peak broadening and loss of reproducibility.
3. If static desorption with a high organic content solvent is required in the SPME procedure, it could be necessary an increase on the oxygen added into the make-up gas to reduce the solvent loading on the plasma and avoid a possible plasma extinction.

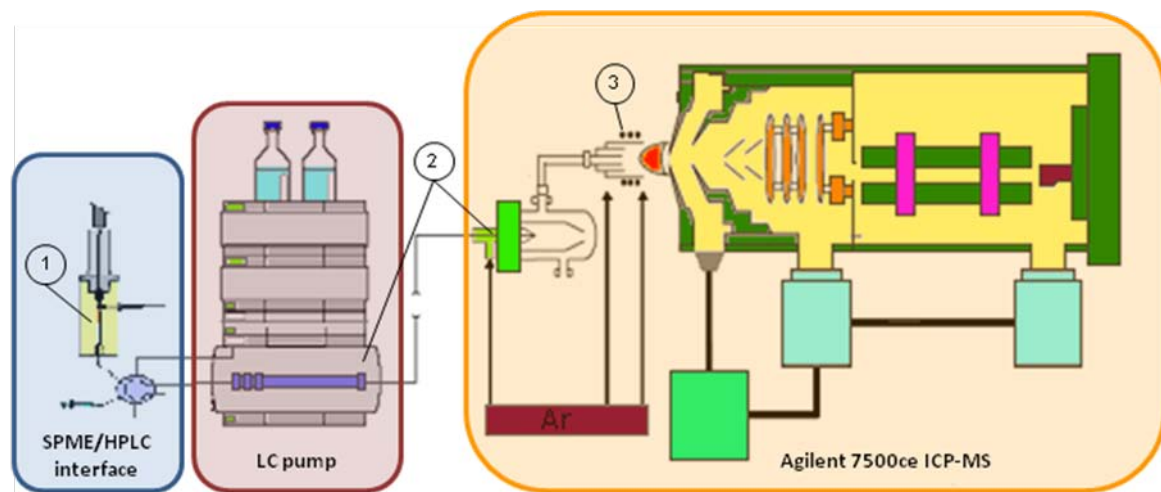


Figure 1. Schematic of the SPME-HPLC-ICP-MS arrangement.

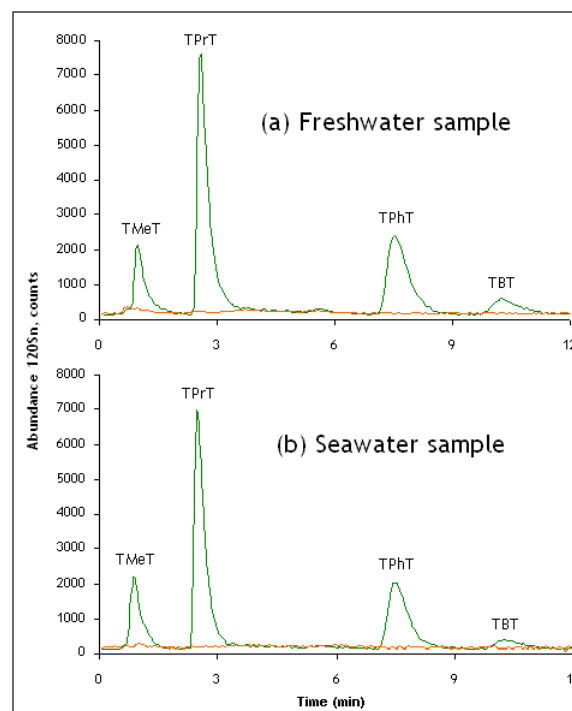
The HPLC system consisted of an Agilent 1100 binary pump fitted with a Rheodyne injection valve, and was coupled to an Agilent 7500ce ICP-MS. The SPME/HPLC interface, a holder assembly and the polymeric fibers were from Supelco. SPME, LC and ICP-MS conditions are summarized in Table 1.

Table 1. SPME, LC and ICP-MS operating parameters.

SPME conditions	
Sample volume	3 mL
Extraction mode and time	Direct immersion at room temperature, 45 min
Fiber coating	PDMS/DVB 60 $\mu\text{m}$
Ionic strength	75 g L <sup>-1</sup> NaCl
Desorption mode	Static (with mobile phase)
Desorption time	5 min + 1 min injection
Chromatographic conditions	
Colum	Mediterranea Sea18 (100 x 2.1 mm; 3 $\mu\text{m}$ )
Flow rate	0.3 mL min <sup>-1</sup>
Injection volume	10 $\mu\text{L}$
Mobile phase	Water:Acetonitrile:Acetic acid (50:40:10)
ICP-MS conditions	
RF Power	1550 W
Oxygen flow	0.1 mL min <sup>-1</sup>
Nebulizer	MicroMist (optimum aspiration level: 0.3-0.6 mL min <sup>-1</sup> )
Spray chamber	Double-pass Scott-type, Peltier cooled to -5 °C
ICP torch injector diameter	1.5 $\mu\text{m}$
Interface cones	Platinum
Integration time per mass	300 ms
Isotopes acquired	<sup>103</sup> Rh, <sup>118</sup> Sn, <sup>120</sup> Sn

## Results

In order to investigate the applicability of the proposed method, five natural freshwater samples from a leisure port on Ullibarri-Ganboa reservoir (Alava, Spain) were studied. No interferences were detected in the analyzed samples and only one of them contained  $1.01 \mu\text{g L}^{-1}$  of TMeT. The applicability of the method to seawater samples was also studied. Five seawater samples from a seaport (Bermeo, Vizcaya, Spain) were also analyzed, but none of the analytes or interferences were detected. In order to evaluate the accuracy of the developed method, both freshwater and seawater samples were used for spiking experiments, spiking with  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  of the analytes (Table 2). Typical SPME/HPLC/ICP-MS chromatograms of spiked freshwater and seawater samples are shown in Fig. 2a and 2b respectively.



**Figure 2.** SPME/HPLC/ICP-MS chromatograms. Orange line: unspiked samples; green line: sample spiked with  $3 \mu\text{g Sn L}^{-1}$  of the analytes.

**Table 2.** Analytical assessment of the method. (Concentrations given as Sn)

Analyte	r	LOD ( $\text{ng L}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{ng L}^{-1}$ )	Intra-day RSD (%, n = 10)		Inter-day RSD (%, n = 10)		Recovery (%; n = 3) (mean $\pm$ SD)	
				$1 \mu\text{g L}^{-1}$	$5 \mu\text{g L}^{-1}$	$1 \mu\text{g L}^{-1}$	$5 \mu\text{g L}^{-1}$	Freshwater	Seawater
TMeT	0.999	135	451	3.18	7.18	7.73	4.47	$104 \pm 9$	$78 \pm 10$
TPrT	0.994	6	19	13.03	5.40	18.20	16.07	$99 \pm 15$	$96 \pm 11$
TPhT	0.991	11	38	13.66	3.54	19.23	16.94	$100 \pm 19$	$71 \pm 13$
TBT	0.999	185	616	13.65	10.91	14.71	3.25	$80 \pm 9$	$85 \pm 8$

## Conclusions

The hyphenation of SPME to HPLC/ICP-MS, never previously carried out, is feasible and could be successfully used. The optimized method based on this coupling offers an attractive new approach for the quantification of selected organotins in both freshwater and seawater samples; a method easy-to-use, reproducible and accurate without complicated sample pre-treatment. It is confirmed that direct immersion SPME is an effective, simple and solventless technique for extraction/preconcentration on speciation studies.

## For additional information

Ugarte, A., Unceta, N., Sampedro, M.C., Goicolea, M.A., Gomez-Caballero, A. and Barrio, R.J. "Solid phase microextraction coupled to liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of organotin compounds in water samples", *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, 24 (3), 347-351.



Cite this: DOI: 10.1039/c1ja10037h

www.rsc.org/jaas

# Development of matrix-matching hydroxyapatite calibration standards for quantitative multi-element LA-ICP-MS analysis: application to the dorsal spine of fish

Ana Ugarte,<sup>a</sup> Nora Unceta,<sup>a</sup> Christophe Pécheyran,<sup>b</sup> M. Aránzazu Goicolea<sup>a</sup> and Ramón J. Barrio<sup>\*a</sup>

Received 28th January 2011, Accepted 7th March 2011

DOI: 10.1039/c1ja10037h

A series of hydroxyapatite pellets were produced to use as matrix-matched standards for LA-ICP-MS analysis of trace metals in the first dorsal spine of tuna fish species (albacore tuna, *Thunnus alalunga*, and Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*). These structures are interesting because they present growth rings and therefore could potentially be used as indicators of environmental pollution. The produced standards containing twelve analytes (Mg, Al, V, Mn, Zn, As, Sr, Rb, Cd, Ba, Hg and Pb) were prepared by co-precipitation of hydroxyapatite from calcium nitrate tetrahydrate and ammonium dihydrogen phosphate. Once synthesized, the concentration of the analytes in the standards was carefully determined in the laboratory and recoveries for the analytes were calculated. The hydroxyapatite enriched standards were found to be homogeneous and provided a linear calibration (correlation coefficients were better than 0.991 for most of the analytes). The methodology was applied to the determination of trace element concentration profiles in cross-sections of tuna fish dorsal spines. Limits of detection were estimated between 1.4 ng g<sup>-1</sup> for cadmium and 751 ng g<sup>-1</sup> for aluminium. The measured values for Mg, Zn, Sr and Pb in pelletized SRM 1486 Bone Meal were in good agreement with certified reference values.

## Introduction

Microchemistry of biomineralized tissues has been widely studied for determining environmental histories of many aquatic organisms as the mineral phase incorporates the heavy metals they are exposed to during development.<sup>1</sup> Some hard calcified tissues show growth annuli or laminae that are routinely used to age the organism. These discernible physical attributes offer the possibility of examining metal incorporation over time, thus providing a historic record of past and recent exposure to trace metals. Among these tissues, fish otoliths have been most broadly assessed to study exposure to environmental pollution,<sup>2-5</sup> but other tissues such as fish scales,<sup>6-8</sup> corals<sup>9-11</sup> or shells<sup>12-16</sup> have been investigated as well. In most of these studies trace element analysis is performed in a spatial scale.

Tuna species were chosen for this study because they are the target of important fisheries in both developed and developing countries, and they are a significant source of food all over the world.<sup>17</sup> The most prized and consumed tuna fish are albacore

tuna (*Thunnus alalunga*) and Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Albacore tuna as well as Atlantic bluefin tuna have different calcified structures which present growth rings used to estimate the age of the individuals. These rings appear with seasonal periodicity, normally growing slowly in winter to form a narrow translucent band and more quickly in summer, giving rise to wider opaque areas, as the season is favourable to growth. The formation and biomineralization of these growth bands depend on metabolic and environmental factors, such as climate, migrations, nutrition, *etc.*<sup>18</sup> The calcified structures traditionally used in tuna growth studies are dorsal spines, otoliths and vertebrae,<sup>19</sup> and also scales.<sup>20</sup> Among these, dorsal spines have often been chosen for growth studies because they are easy to extract since there is no need to dissect the fish, and have obvious and well-defined growth bands or annuli.<sup>21,22</sup> Furthermore, compared with other hard parts, the extraction of the dorsal spine does not interfere with the market value of the fish. Additionally, given that estimations of the age and growth rates are performed from thin sections made at the base of the first spine of the first dorsal fin,<sup>23-25</sup> laborious sample preparation is not required.

Despite the broad use of the first spine of the first dorsal fin of Atlantic bluefin and albacore in growth studies, to date and to the best of our knowledge, there has not been any investigation referring to the use of this calcified structure as an indicator of exposure to environmental pollution. Actually, taking into

<sup>a</sup>Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country (UPV/EHU), Paseo de la Universidad 7, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain. E-mail: r.barrio@ehu.es; Fax: +34 945 014351; Tel: +34 945 013055

<sup>b</sup>Université de Pau et des Pays de l'Adour/CNRS, Laboratoire de Chimie Analytique et Bio-Inorganique UMR 5254 IPREM, 2 avenue Angot, 64053 PAU Cedex 9, France

1 account the similarities between the spine and other hard structures like otoliths and scales, it could be expected that the mineral fraction of the spine incorporates the trace elements it is exposed to during growth.

5 Currently, laser ablation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) is one of the preferred techniques for the analysis of trace elements in biominerals due to its ability for direct solid sampling and its excellent sensitivity. LA-ICP-MS enables the determination of major, minor and trace elements in solid materials both in bulk and spatially resolved analysis, as well as isotope ratio measurements.<sup>26,27</sup> However, one of the main limitations of LA-ICP-MS is the occurrence of non-stoichiometric effects in the transient signals, defined as elemental fractionation, a situation in which the composition of the mass analyzed is not representative of the bulk sample.<sup>28,29</sup> All processes involved in LA-ICP-MS (the aerosol formation, the transport of the aerosol into the ICP, and the conversion of the aerosol into ions within the ICP) may potentially alter the stoichiometric composition of the laser generated aerosol depending on the chemical and physical properties of the elements, resulting in unknown contributions to elemental or isotopic fractionation effects.<sup>30,31</sup> Nevertheless, such fractionation related inaccuracies can largely be avoided if standards (preferably reference materials) of similar composition and morphology to the sample under investigation (called matrix-matching standards) are used for calibration.<sup>32</sup> Matrix-matching is necessary because the ablation rate varies with the sample matrix. However, reference materials do not cover every type of sample and/or analytes. If suitable SRMs are not available, synthetic matrix-matched laboratory standards can be produced in-house for quantification.<sup>14,33</sup>

35 The mineral fraction of fishbone is composed of hydroxyapatite, with simplified formula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . There are two reference materials that match with this matrix: NIST SRM 1486 Bone Meal (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) and NIST SRM 1400 Bone Ash. However, these two reference materials are certified for only 8 elements (Ca, Mg, P, Fe, Pb, K, Sr and Zn), though information values are available for more analytes. Bones and dentin, which have similar matrix to that of fishbone, have been analyzed by laser ablation ICP-MS in several studies. In these studies different calibration strategies have been utilized: (a) nonmatrix-matching calibration with a glass reference material,<sup>34</sup> (b) one point calibration using pelletized NIST SRM 1486 and SRM 1400,<sup>35</sup> (c) 4 level calibration with New York State Department of Health candidate reference materials for lead in bone,<sup>36</sup> (d) precipitation of hydroxyapatite and subsequent addition of multi-element solution,<sup>37</sup> or (e) dissolution of pure hydroxyapatite, posterior equilibration with multi-element solution and final evaporation to dryness.<sup>38</sup> Gruhl *et al.*<sup>37</sup> reported that, with strategy (d), the spiked elements are presumably located at the surface of the powder particles, something that could be avoided by co-precipitation of the hydroxyapatite with the analyte elements. However, to our knowledge, co-precipitation of hydroxyapatite with the analytes has not yet been reported for LA-ICP-MS matrix-matching calibration.

The main objective of this work has been the development of a LA-ICP-MS based method that enables matrix-matching quantitative analysis of trace element concentrations in the first

1 spine of the first dorsal fin of tuna fish. An original procedure has been devised for producing synthetic laboratory matrix-matched standards: co-precipitation of hydroxyapatite from calcium nitrate tetrahydrate and ammonium dihydrogen phosphate. The homogeneity of these standards and the analytical performance (sensitivity, detection limits, precision and accuracy) achieved with LA-ICP-MS have been studied. In order to assess the influence of matrix-matching calibration, the enriched hydroxyapatite standards and nonmatrix-matched calibration with the NIST 612 glass have been compared. The methodology has been used finally for the determination of trace element concentration profiles in tuna fish dorsal spines.

## Experimental

### Tuna fish spine samples

15 Tuna fish samples of Atlantic bluefin tuna and albacore tuna examined in this study were purchased from local fish shops. The procedure to remove the spine was as follows: initially the membrane between the first two spines was cut, then the first spine was tilted forward and turned on itself, first in one way and then in the other way. Once extracted, the spines were washed with Milli-Q water and air-dried. Finally, a cross-section at the point near the condyle base (Fig. 1) of approximately 1.3 mm thickness was cut with an Isomet low-speed saw with a diamond blade (Buehler, Dusseldorf, Germany) lubricated with Milli-Q water. The sections were mounted on glass slides.

### LA-ICP-MS parameters

30 For the LA-ICP-MS measurements an UP266 laser ablation system from New Wave Research Co. Ltd (Huntingdon, UK) connected to an Agilent 7500ce ICP mass spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used. The laser was operated in Q-switch mode, working with 266 nm wavelength and a pulse duration of 4 ns, with a maximum energy of 4 mJ. Typical operating conditions are given in Table 1. The laser-produced aerosol was transported with a 1 m long polyurethane tube (i.d. of 4 mm) by a helium gas stream and then mixed *via* a Y-connector with a liquid aerosol (nebulized by means of a microconcentric nebulizer) before entering the plasma. The Y-connector was specially designed and manufactured for the

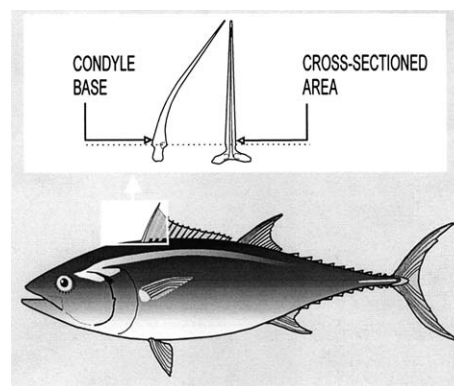


Fig. 1 Details of the first dorsal spine in an Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) and of the cross-sectioned area.

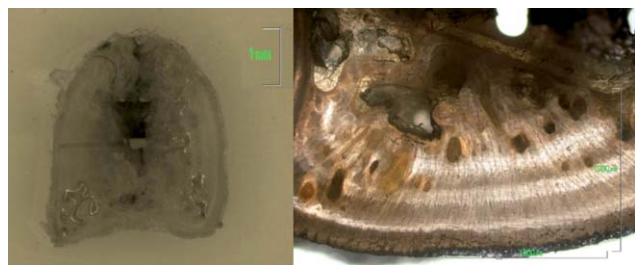
**Table 1** LA-ICP-MS operating conditions

<b>Laser</b>	UP266 (New wave research)	
Wavelength	266 nm	
Pulse width	4 ns	
Repetition rate	20 Hz	
Spot size (diameter)	120 $\mu\text{m}$	
He gas flow	0.44 L $\text{min}^{-1}$	
Scan speed	<i>Preablation</i>	<i>Ablation</i>
Energy	50 $\mu\text{m s}^{-1}$	5 $\mu\text{m s}^{-1}$
Fluence	40%	60%
<b>ICP-MS</b>	$\sim 2 \text{ J cm}^{-2}$ 8.2–9.6 J $\text{cm}^{-2}$	
Rf power	7500ce (Agilent)	
Nebulizer	1500 W	
Spray chamber	Microconcentric: MicroMist	
Argon flow rates:	Double-pass Scott-type	
Plasma gas	15 L $\text{min}^{-1}$	
Nebulizer gas	0.75 L $\text{min}^{-1}$	
Auxiliary gas	1.0 L $\text{min}^{-1}$	
Isotopes	$^{24}\text{Mg}$ , $^{26}\text{Mg}$ , $^{27}\text{Al}$ , $^{43}\text{Ca}$ , $^{51}\text{V}$ , $^{55}\text{Mn}$ , $^{66}\text{Zn}$ , $^{68}\text{Zn}$ , $^{75}\text{As}$ , $^{84}\text{Sr}$ , $^{85}\text{Rb}$ , $^{86}\text{Sr}$ , $^{111}\text{Cd}$ , $^{114}\text{Cd}$ , $^{135}\text{Ba}$ , $^{138}\text{Ba}$ , $^{205}\text{Tl}$ , $^{202}\text{Hg}$ , $^{208}\text{Pb}$	
Dwell time	25 ms	
Signal acquisition	Time resolved analysis (TRA)	

physical requirements of our ICP-MS system. This dual-flow introduction system enabled complete and easy optimization of the LA-ICP-MS coupling when nebulizing 1 ng  $\text{g}^{-1}$  solution of the elements employed for tuning. Furthermore, during laser ablation analyses, the plasma was kept under wet conditions by the continuous nebulisation of a 1 ng  $\text{g}^{-1}$  thallium standard solution, which was also used to monitor the stability of the plasma.

As the annuli on the spines of tuna present a concentric distribution (Fig. 2), single-line scanning-ablation mode from the centre of the spine to the edge was found to adapt well for the purpose of this study. The laser was focused on the sample surface. Before ablation, the area of interest was preablated with the laser operating in a fast-scanning mode (Table 1) to remove the first thin layer that was likely to be contaminated. During ablation, the laser was operated with a continuous sample translation speed of 5  $\mu\text{m s}^{-1}$ . In each sample the ablation line length was adjusted to the size of the sample. The hydroxyapatite standards as well as the NIST 612 glass and pelletized SRM 1486 Bone Meal were analysed by the same procedure as the samples, ablating 500  $\mu\text{m}$  scan lines. Helium background measurement was systematically collected before each analysis.

Nineteen isotopes corresponding to 14 elements (12 analytes, calcium and thallium) were analysed (Table 1). The analytes (Mg, Al, V, Mn, Zn, As, Sr, Rb, Cd, Ba, Hg and Pb) were



**Fig. 2** Images of tuna fish dorsal spine sections. (a) Atlantic bluefin tuna (*T. thynnus*) spine section. (b) Detail of the growth annuli.

selected because of their environmental relevance. The intensity of the isotopes of interest was systematically normalized against the  $^{43}\text{Ca}$  signal after subtraction of the mean background signal. Normalization is essential in LA-ICP-MS to compensate for variations in ablation yield because of the laser energy drift and sample density. Calcium was selected as the normalizing element because it is homogeneously distributed in fishbone hydroxyapatite matrix, hydroxyapatite standards, SRM 1486 and NIST 612. The fishbone concentration of calcium is slightly variable among individuals, and, therefore, it was necessary to take this into account for normalization.

### Preparation of enriched hydroxyapatite calibration standards

Three co-precipitated hydroxyapatite standards containing Mg, Al, V, Mn, Zn, As, Rb, Sr, Cd, Ba, Hg and Pb were prepared (Table 2) and pressed into pellets. Hydroxyapatite was precipitated from pure calcium nitrate tetrahydrate ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; Merck, Suprapur) and ammonium dihydrogen phosphate ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , Merck, Suprapur) in a ISO Class 7 clean room. 0.48 M  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  and 1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  solutions were prepared in Milli-Q water (18.2 MOhms; Millipore) and pH adjusted to 10 by adding ammonium hydroxide ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 25%, Merck, Suprapur). 25 mL of the  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  solution were added drop-wise and under magnetic stirring to 25 mL of the  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  solution. Then the mixture was shaken in an orbital shaker (KS-15 shaker, Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Germany) for 3 hours and the precipitate was aged for 5 days. After that, the precipitate was filtered, cleaned with Milli-Q water and subjected to heat treatment at 450  $^\circ\text{C}$  for 3 hours. In order to obtain the enriched hydroxyapatite standards containing the co-precipitated trace elements,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  solution was spiked with a multi-element solution prior to the drop-wise addition of the  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  solution. Three multi-element solutions were prepared from individual 1000  $\mu\text{g g}^{-1}$  stock solutions (SCP Science; Courtaboeuf Cedex, France) for all the analytes except for magnesium, which was prepared from a solid standard ( $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6(\text{H}_2\text{O})$ , 99.999% Puratrem; Strem Chemicals, Strasbourg, France) because of its higher concentration. The concentration of each element in the spiking solutions was adjusted to achieve suitable concentrations on the final enriched hydroxyapatite standards for external calibration of the spine samples by LA-ICP-MS. These concentrations were calculated based on a previous digestion and analysis of some samples by ICP-MS in conventional solution mode elemental analysis. After manual homogenisation of the obtained hydroxyapatite powder in an agate mortar for about 10 minutes, 20 mg of the precipitate was finally pressed into 3 mm diameter dies at a pressure of 0.5 tons for 2 min (hydraulic press; Eurolabo, France). The resulting pellets were then individually stored in small plastic containers. A blank hydroxyapatite standard was also produced in a similar way without spiking with the multi-element solution the ammonium dihydrogen phosphate solution.

### Solution mode elemental analysis

Solution mode analysis was performed to analyze some spines prior to enriched hydroxyapatite co-precipitation and to determine the concentration of the analytes in the synthesized

**Table 2** Nominal concentrations of the analytes in the enriched hydroxyapatite standards and effective concentrations with the relative standard deviations (RSD, %) quantified by solution based ICP-MS

Analyte	Nom. conc./ $\mu\text{g g}^{-1}$	Effective conc./ $\mu\text{g g}^{-1}$	Analyte	Nom. conc./ $\mu\text{g g}^{-1}$	Effective conc./ $\mu\text{g g}^{-1}$	Analyte	Nom. conc./ $\mu\text{g g}^{-1}$	Effective conc./ $\mu\text{g g}^{-1}$
Mg	0.0	190 (12)	Zn	0.0	1.48 (3.1)	Cd	0.0	0.0039 (21)
	2260	1170 (3.9)		11	7.8 (2.6)		0.01	0.012 (9.2)
	6770	2900 (2.7)		54	33.6 (1.7)		0.04	0.029 (7.7)
	13600	4920 (2.5)		200	104 (1.3)		0.13	0.076 (7.0)
Al	0.0	1.5 (12)	As	0.0	0.017 (11)	Ba	0.0	0.057 (7.2)
	1.9	3.1 (4.8)		0.57	0.587 (0.6)		2.9	0.99 (3.3)
	6.3	7.3 (2.6)		2.2	2.14 (2.4)		8.7	2.65 (0.8)
V	19	20.7 (2.7)	Rb	9.2	9.04 (0.2)	Hg	20	6.41 (0.7)
	0.0	0.012 (17)		0.0	0.010 (56)		0.0	0.028 (9.2)
	0.12	0.121 (4.3)		2.1	0.091 (8.6)		0.19	0.034 (14)
Mn	0.31	0.290 (1.8)	Sr	6.0	0.165 (2.5)	Pb	0.81	0.041 (7.2)
	1.1	1.04 (1.8)		18	0.468 (1.4)		2.7	0.125 (3.9)
	0.0	0.131 (1.8)		0.0	25 (20)		0.0	0.037 (17)
	3.4	3.35 (1.6)		410	178 (2.4)		0.21	0.162 (5.9)
	11	10.68 (0.9)		1020	377 (0.8)		0.62	0.54 (4.3)
	29	27.4 (2.8)	1740	720 (2.2)	1.7	1.39 (1.1)		

enriched hydroxyapatite standards once they were co-precipitated. It was also used for calcium quantification in the spine samples.

For solution mode analyses spines or enriched hydroxyapatite calibration standard powders were digested in a microwave oven (Berghof Speedwave® Four, Eningen, Germany). Approximately 0.3 g of sample was weighed and transferred to a Teflon™ vessel. Then 3 mL of concentrated nitric acid purified by sub-boiling distillation in a Teflon™ still (Savillex Corp., Minnetonka, Minnesota, USA) and 2 mL of Milli-Q water were added. The vessels were closed and heated by a five step MW program which reached 190 °C. After cooling, samples were diluted to 15 g with water. A final 1 : 10 dilution was carried out for the analyses. Reliable quantification of the analytes was achieved by conventional solution nebulisation ICP-MS using <sup>89</sup>Y, <sup>140</sup>Ce and <sup>193</sup>Ir as internal standards and matrix-matched calibration.

## Results and discussion

### Evaluation of the enriched hydroxyapatite calibration standards

**Element recovery.** To correct for contamination or losses during preparation of the enriched hydroxyapatite standards, recovery during co-precipitation was assessed for each element of interest. Three aliquots of each enriched hydroxyapatite standard powder were digested and analytes quantified by ICP-MS as previously described.

Results from determination of recovery during co-precipitation are presented in Table 2. Comparison of nominal and effective concentrations shows that for some of the elements the amounts are in good agreement with the values expected, thus indicating that co-precipitation was nearly quantitative. For a number of analytes, however, the recovery is very poor (less than 5% for rubidium and mercury; and less than 40% for magnesium, strontium and barium). These poorly efficient precipitations indicate that careful analysis of the enriched hydroxyapatite standards is essential prior to their use as calibration standards in LA-ICP-MS measurements. High solubility

coefficients ( $K_s$ ), complexation processes or the chemical forms of precipitated elements could explain these poor recoveries.

To confirm hydroxyapatite formation by the employed co-precipitation method, the crystallinity of the obtained powder was verified by XRD (INEL XRG 3000, Artenay, France). Results confirmed hydroxyapatite formation under the specified conditions.

**Homogeneity of the pellets.** The homogeneity of the elemental composition of the three enriched hydroxyapatite (HA) standards was studied by ablating five zones (500  $\mu\text{m}$  scan lines, operating conditions as listed in Table 1) randomly distributed on each pellet surface. Reproducibility (%RSD) for the measurements is reported in Table 3. In most cases, the reproducibility of the signals was below 15%. The highest RSD values correspond, in general, with the less concentrated elements. These results showed that the used co-precipitation method for hydroxyapatite results in homogeneous distribution of the selected analytes in the obtained powder. Reproducibility of the analyte signals in the NIST 612 for five measurements performed in the same way as in hydroxyapatite standards is also presented. In this case, RSD values below 10% for most elements indicated the good reproducibility of the LA-ICP-MS coupling. The higher RSD value obtained for mercury (20.4%) in the NIST 612 could be explained by the comparatively low signals obtained for this analyte.

**Analytical assessment for calibration purposes.** The analytical performance of the synthesized pressed powder hydroxyapatite standards for calibration was evaluated in terms of linearity, limits of detection and accuracy.

The linearity was tested analyzing the enriched hydroxyapatite standard pellets by LA-ICP-MS to produce calibration graphs. The analyses resulted in good linearity for most of the elements (Table 3), confirming the good correlation between the signal response of the ablated aerosol and the calculated concentrations of the hydroxyapatite calibration standards. For most of the elements, the correlation coefficient is better than 0.991. Cadmium and mercury correlated worse, mainly due to their low



**Table 3** Reproducibility of the analyte signals in the NIST 612, homogeneity of enriched hydroxyapatite pellets and analytical performance of the method. LA-ICP-MS operating conditions given in Table 1

Analyte	Reproducibility %RSD ( $n = 5$ )				Concentration range/ $\mu\text{g g}^{-1}$	Correlation coefficient, $r$	LOD/ $\text{ng g}^{-1}$
	NIST 612	HA Level 1	HA Level 2	HA Level 3			
$^{24}\text{Mg}$	6.7	8.8	8.4	7.1	190–4920	0.9948	45
$^{27}\text{Al}$	5.6	24	16	9.9	1.5–20.7	0.9936	750
$^{51}\text{V}$	4.8	6.7	6.1	1.6	0.012–1.04	0.9997	2.1
$^{55}\text{Mn}$	2.9	9.2	9.7	2.4	0.131–27.4	0.9980	25
$^{66}\text{Zn}$	6.2	13	7.8	14	1.48–104	0.9981	82
$^{75}\text{As}$	8.0	19	13	11	0.017–9.04	0.9982	130
$^{85}\text{Rb}$	6.2	10	3.4	12	0.010–0.468	0.9993	6.1
$^{86}\text{Sr}$	8.0	10	9.5	13	25–720	0.9980	14
$^{111}\text{Cd}$	8.1	13	17	11	0.0039–0.076	0.9690	1.4
$^{138}\text{Ba}$	8.9	8.3	10	10	0.057–6.41	0.9915	4.6
$^{202}\text{Hg}$	20	19	14	14	0.028–0.125	0.9703	7.0
$^{208}\text{Pb}$	9.5	23	15	15	0.037–1.39	0.9997	3.6

concentrations and the uncertainty associated with the solution-based determination of these elements in the enriched hydroxyapatite powders.

The limits of detection were defined as 3 times the standard deviation for five replicate measurements of the corresponding analyte signal of a gas blank (helium) normalized to the subsequent  $^{43}\text{Ca}$  signal of the blank hydroxyapatite standard.

Limits of detection are reported in Table 3. The LODs ranged between  $1.4 \text{ ng g}^{-1}$  for cadmium and  $751 \text{ ng g}^{-1}$  for aluminium.

Accuracy of the analytical method was assessed by the analysis of the reference material SRM 1486 Bone Meal as a pellet against the calibration graphs obtained from the enriched hydroxyapatite standards. Table 4 shows the results for five measurements of the SRM 1486 pellet. Analyte contents measured by LA-ICP-MS are in good agreement with the certified values and within the standard deviation of the measurement, confirming the reliability of the enriched hydroxyapatite standards.<sup>41</sup>

#### Comparison of nonmatrix-matched and matrix-matching calibration

In order to assess the influence of matrix-matching calibration, results obtained for quantification of SRM 1486 Bone Meal by external calibration using the co-precipitated enriched hydroxyapatite standards and by nonmatrix-matching calibration with

NIST 612 were compared. For nonmatrix-matching calibration, the method outlined by Longerich *et al.*<sup>42</sup> was used to calculate the element concentrations in the SRM 1486. Normalized signal was converted to concentration using the equation:

$$C_{A_s} = \frac{\text{Signal}_{A_s}}{S} \quad (1)$$

where  $\text{Signal}_{A_s}$  is the mean normalized signal (raw time resolved data collected in counts per second minus the mean background intensity, also in counts per second, normalized against Ca) of the analyte in the sample and  $S$  is the normalized sensitivity.  $S$  ( $\text{g } \mu\text{g}^{-1}$ ) is determined based on the calibration standard (NIST 612), and corrects for variations in the mass of ablated sample. The normalized sensitivity ( $S$ ) is determined based on the following equation:

$$S = \frac{\text{Signal}_{A_{\text{cal}}} \text{Con}_{\text{IS}_{\text{cal}}}}{\text{Con}_{A_{\text{cal}}} \text{Con}_{\text{IS}_{\text{s}}}} \quad (2)$$

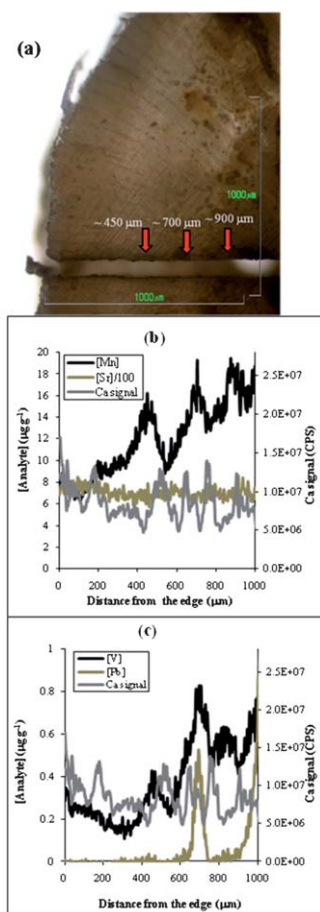
where  $\text{Signal}_{A_{\text{cal}}}$  is the mean normalized signal of the analyte in the calibration material;  $\text{Con}_{A_{\text{cal}}}$  is the concentration of the analyte in the calibration material; and  $\text{Con}_{\text{IS}_{\text{cal}}}$  and  $\text{Con}_{\text{IS}_{\text{s}}}$  are the concentrations of the internal standard (calcium) in the calibration material and SRM 1486 respectively.

Among the analytes only strontium and lead are certified in both NIST 612 and SRM 1486, but magnesium and zinc reference

**Table 4** Results from the quantitative analysis of the reference material SRM 1486 Bone Meal obtained with: (1) calibration with co-precipitated enriched hydroxyapatite standards and (2) nonmatrix-matching calibration with NIST 612. Element concentrations expressed in  $\mu\text{g g}^{-1}$  and uncertainty given as 95% confidence intervals

Analyte	Reference value	Measured concentration (1)	Measured concentration (2)
Mg	$4660 \pm 170^a$	$4629 \pm 328$	$5200 \pm 571$
Al	$<1^b$	$1.6 \pm 0.3$	$0.9 \pm 0.1$
V	$0.07 \pm 0.02^c$	$0.059 \pm 0.005$	$0.05 \pm 0.02$
Mn	$1^b$	$1.2 \pm 0.2$	$1.1 \pm 0.3$
Zn	$147 \pm 16^a$	$144 \pm 14$	$101 \pm 10$
As	$0.006^b$	$<\text{LOD}$	$0.3 \pm 0.2$
Rb	—	$0.35 \pm 0.08$	$0.35 \pm 0.07$
Sr	$264 \pm 7^a$	$276 \pm 5$	$310 \pm 45$
Cd	$0.003^b$	$0.002 \pm 0.001$	$0.006 \pm 0.004$
Ba	$270 \pm 7^c$	$266 \pm 59$	$314 \pm 46$
Hg	$<0.05^d$	$0.030 \pm 0.006$	—
Pb	$1.335 \pm 0.014^a$	$1.3 \pm 0.2$	$1.3 \pm 0.4$

<sup>a</sup> Certified value provided by NIST. <sup>b</sup> Non-certified value provided by NIST. <sup>c</sup> From Zaichick *et al.*<sup>39</sup> <sup>d</sup> From Dolan *et al.*<sup>40</sup>

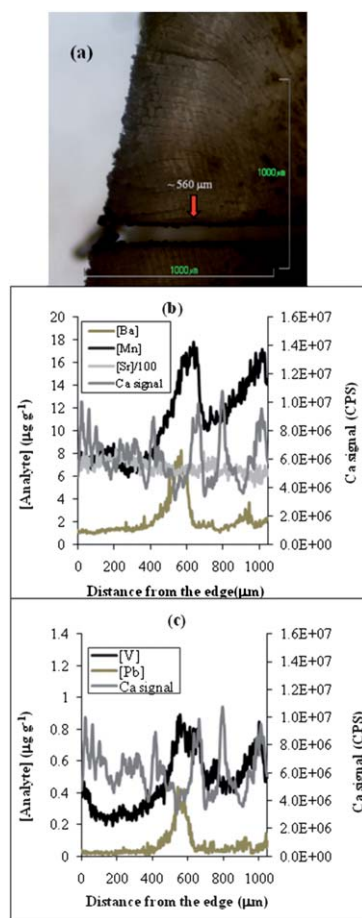


**Fig. 3** Ablation of an Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) first dorsal spine sample: (a) photograph of the ablated area; (b) Mn and Sr concentration profiles and  $^{43}\text{Ca}$  raw signal; (c) V and Pb concentration profiles together with  $^{43}\text{Ca}$  raw signal. LA-ICP-MS operating conditions given in Table 1.

values were compiled from the GeoReM online database.<sup>43</sup> In Table 4 results for the quantification of magnesium, zinc, strontium and lead in SRM 1486 Bone Meal with the two calibration methods are given. For nonmatrix-matched calibration with NIST 612 glass, for all the analytes except Zn, uncertainties associated to the calculated concentrations were higher than those obtained by matrix-matched calibration with enriched hydroxyapatite standards. Furthermore, for Mg and Sr, measured concentrations with nonmatrix-matched method were less accurate, while for Zn this concentration was below the certified reference value, which might indicate elemental fractionation. For Pb, however, the difference between the two calculated concentrations was smaller, even though the matrix-matching method also generated a more accurate and precise result.

### Trace element profiles in tuna fish dorsal spine

Even though it is not the main objective of this paper to discuss trace element incorporation in hard calcified tissues, two examples will be given to illustrate the use of the co-precipitated hydroxyapatites as calibration standards for the quantification of elements in the first dorsal spine of tuna fish. In Fig. 3 and 4, images for an Atlantic bluefin and an albacore tuna samples,



**Fig. 4** Ablation of an albacore tuna (*Thunnus alalunga*) first dorsal spine sample: (a) photograph of the ablated area; (b) Mn, Ba, and Sr concentration profiles and  $^{43}\text{Ca}$  raw signal; (c) V and Pb concentration profiles together with  $^{43}\text{Ca}$  raw signal. LA-ICP-MS operating conditions given in Table 1.

respectively, together with some representative element concentration profiles and the raw signals of  $^{43}\text{Ca}$  are shown. Since laser ablation was performed at a constant scan speed, time coordinates of individual data points were transformed into distances. Distance zero corresponds to the edge of the spine.

The first example corresponds to an Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). As shown in Fig. 3, manganese and vanadium (Fig. 3b and c), presented concentration increments at several points, which are those that are marked with arrows in the photograph. The first concentration increment appeared at the beginning of the second opaque area of the spine (~450  $\mu\text{m}$ ), corresponding with the beginning of the warm season; the next one was in the second annulus (~700  $\mu\text{m}$ ), corresponding with the winter two years before the death of the individual; and the last concentration peak was in the opaque area (~900  $\mu\text{m}$ ) previous to this second growth annulus. Lead only showed a concentration peak at approximately 700  $\mu\text{m}$  from the edge, in the second annulus (Fig. 3c). Similar concentration profiles to that of lead were observed for magnesium, aluminium, zinc, arsenic, rubidium and barium.

The second example (Fig. 4), obtained from an albacore tuna (*Thunnus alalunga*), showed similar concentration profiles. In this case, there was a concentration peak at approximately 560  $\mu\text{m}$

1 from the edge of the spine, in the second opaque area (warm  
season), for some of the analytes (shown for Mn, Ba, V and Pb in  
Fig. 4b and c, but also observed for Mg, Al, Zn, As and Rb).

5 In both examples Sr showed a constant concentration over the  
ablated area ( $\sim 700 \mu\text{g g}^{-1}$ , Fig. 3b and 4b) and Cd and Hg  
presented low contents, with mean concentrations of 0.04 and  
0.05  $\mu\text{g g}^{-1}$  respectively.

10 As for the interpretation of the observed concentration  
increments for some analytes, it is beyond the scope of this paper  
and would require better knowledge about the samples under  
investigation (capture location, migration movements, etc.).

## Conclusions

15 The devised procedure for the co-precipitation of 12 analytes into  
the hydroxyapatite matrix has turned out adequate for the  
production of homogeneous solid calibration standards for LA-  
ICP-MS analyses. The availability of these standards has enabled  
quantitative analysis of the reference material SRM 1486,  
20 obtaining values in good agreement with the certified ones, and  
more accurate and precise than the values obtained by the non-  
matrix-matched calibration. Once the calibration standards are  
prepared, the ease and rapidity of the analysis have been demon-  
strated, without tedious sample preparation steps. The preliminary  
25 information shows interesting variations for some of the analysed  
elements in Atlantic bluefin tuna and albacore tuna samples. The  
obtained results will make it possible to use the developed LA-  
ICP-MS methodology for the measurement of metals in the first  
dorsal spine in future studies on marine pollution, migration of  
30 tuna fish and/or bioaccumulation of trace elements in these  
species. It is also noticeable that the produced solid standards  
could be used for bone analysis by LA-ICP-MS since the matrix,  
hydroxyapatite, is the same for fishbone and bone.

## Acknowledgements

35 A.U. acknowledges the Spanish Ministry of Education for  
partial financial support under mobility grant TME2009-00777  
and the Research Office of UPV/EHU for her Pre-doctoral grant.  
The authors are also grateful to A. Castetbon and R. Dedryvère  
(Université de Pau, France) for advice on the precipitation of  
40 hydroxyapatite standards and help with XRD analysis, respec-  
tively. Technical and human support provided by Alava Central  
Service of Analysis, SGIker (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ,  
ESF) is gratefully acknowledged.

## References

- 1 P. M. Outridge, G. Veinott and R. D. Evans, *Environ. Rev.*, 1995, **3**, 160–170.
- 2 S. R. Thorrold, C. M. Jones and S. E. Campana, *Limnol. Oceanogr.*, 1997, **42**, 102–111.
- 3 S. E. Campana, *Mar. Ecol.: Prog. Ser.*, 1999, **188**, 263–297.
- 4 S. E. Campana, G. A. Chouinard, J. M. Hanson, A. Frechet and J. Bratley, *Fish. Res.*, 2000, **46**, 343–357.
- 5 S. E. Campana and S. R. Thorrold, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 2001, **58**, 30–38.
- 6 C. C. Coutant and C. H. Chen, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1993, **50**, 1318–1323.
- 7 B. K. Wells, S. R. Thorrold and C. M. Jones, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 2003, **60**, 361–369.
- 8 M. Hola, J. Kalvoda, O. Babek, R. Brzobohaty, I. Holoubek, V. Kanicky and R. Skoda, *Environ. Geol.*, 2009, **58**, 141–151.

- 9 S. V. Smith, R. W. Buddemeier, R. C. Redalje and J. E. Houck, *Science*, 1979, **204**, 404–407.
- 10 D. W. Lea, G. T. Shen and E. A. Boyle, *Nature*, 1989, **340**, 373–376.
- 11 M. McCulloch, S. Fallon, T. Wyndham, E. Hendy, J. Lough and D. Barnes, *Nature*, 2003, **421**, 727–730.
- 12 D. W. Lea and P. A. Martin, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1996, **60**, 3143–3149.
- 13 B. J. Becker, F. J. Fodrie, P. A. McMillan and L. A. Levin, *Limnol. Oceanogr.*, 2005, **50**, 48–61.
- 14 A. Barats, C. Pecheyrán, D. Amouroux, S. Dubascoux, L. Chauvaud and O. F. X. Donard, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **387**, 1131–1140.
- 15 A. Barats, D. Amouroux, C. Pecheyrán, L. Chauvaud and O. F. X. Donard, *Environ. Sci. Technol.*, 2008, **42**, 86–92.
- 16 A. Barats, D. Amouroux, C. Pecheyrán, L. Chauvaud, J. Thebault and O. F. X. Donard, *Biogeosciences*, 2010, **7**, 233–245.
- 17 W. H. Bayliff, J. I. Leiva Moreno and J. Majkowski, *Second Meeting of the Technical Advisory Committee of the FAO Project Management of Tuna Fishing Capacity: Conservation and Socio-economics*, Madrid, Spain, 2004.
- 18 M. Ruiz, E. Rodríguez-Marín and J. Landa, *Protocol for sampling of hard parts for bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) growth studies*, <http://www.iccat.int/Documents/SCRS/Other/BFT%20age%20sampling%20EN.pdf>, accessed 13th October, 2010.
- 19 J. R. Rooker, J. R. A. Bremer, B. A. Block, H. Dewar, G. De Metrio, A. Corriero, R. T. Kraus, E. D. Prince, E. Rodríguez-Marín and D. H. Secor, *Rev. Fish. Sci.*, 2007, **15**, 265–310.
- 20 R. T. Yang, *China Fish. Mon.*, 1970, **213**, 3–16.
- 21 P. Megalofonou, *J. Fish Biol.*, 2000, **57**, 700–715.
- 22 P. Megalofonou and G. de Metrio, *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 2000, **80**, 753–754.
- 23 G. Compeán-Jimenez and F. X. Bard, *Proceedings of the International Workshop on Age Determination of Oceanic Pelagic Fishes: Tunas, Billfishes, and Sharks*, NOAA Technical Report 8, 1983.
- 24 A. González-Garcés and A. C. Fariña-Perez, *Proceedings of the International Workshop on Age determination of Oceanic Pelagic Fishes: Tunas, Billfishes and Sharks*, NOAA Technical Report 8, 1983.
- 25 E. Rodríguez-Marín, J. Landa, M. Ruiz, D. Godoy and C. Rodríguez-Cabello, *Collective Volume of Scientific Papers, ICCAT*, 2004, **56**, pp. 1168–1174.
- 26 J. S. Becker, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2002, **57**, 1805–1820.
- 27 D. Günther and B. Hattendorf, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 255–265.
- 28 H. R. Kuhn, M. Guillong and D. Gunther, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 1069–1074.
- 29 I. Krosiakova and D. Günther, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 51–62.
- 30 J. Gonzalez, X. L. Mao, J. Roy, S. S. Mao and R. E. Russo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2002, **17**, 1108–1113.
- 31 C. C. Garcia, H. Lindner and K. Niemax, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, **24**, 14–26.
- 32 B. Fernández, F. Claverie, C. Pécheyrán and O. F. X. Donard, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2007, **26**, 951–966.
- 33 V. R. Bellotto and N. Miekeley, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 2000, **367**, 635–640.
- 34 A. M. Ghazi, S. Shuttleworth, S. J. Angulo and D. H. Pashley, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2000, **15**, 1335–1341.
- 35 T. Uryu, J. Yoshinaga, Y. Yanagisawa, M. Endo and J. Takahashi, *Anal. Sci.*, 2003, **19**, 1413–1416.
- 36 D. J. Bellis, K. M. Hetter, J. Jones, D. Amarasiwardena and P. J. Parsons, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 948–954.
- 37 S. Gruhl, F. Witte, J. Vogt and C. Vogt, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, **24**, 181–188.
- 38 C. Stadlbauer, C. Reiter, B. Patzak, G. Stinger and T. Prohaska, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **388**, 593–602.
- 39 V. Zaichick, S. Zaichick, V. Karandashev and S. Nosenko, *Biol. Trace Elem. Res.*, 2009, **129**, 107–115.
- 40 S. P. Dolan, D. A. Nortrup, P. M. Bolger and S. G. Capar, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 1307–1312.
- 41 *FDA Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation*, US-FDA, EEUU, 2001.
- 42 H. P. Longrich, S. E. Jackson and D. Guenther, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1996, **11**, 899–904.
- 43 K. P. Jochum and F. Nehring, *GeoReM, NISTSRM 612 GeoReM preferred values*, <http://georem.mpch-mainz.gwdg.de>, accessed 2nd December, 2010.



# **Evaluation of the bioaccumulation of trace elements in tuna species by correlation analysis between their concentrations in muscle and first dorsal spine using microwave assisted digestion and ICP-MS**

Ana Ugarte, Zuriñe Abrego, Nora Unceta, M. Aránzazu Goicolea and Ramón J. Barrio

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of the Basque Country, UPV/EHU, Paseo de la Universidad 7, 01006 Vitoria-Gasteiz, Spain*

## **ABSTRACT**

Environmental pollution by metals is a recognized problem worldwide. As a result of the exposure to this pollution, marine species may bioaccumulate metals in both muscle and fishbone, as has been demonstrated in some species of tuna. The objective of this study has been the development and optimization of an inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) based method, which allows the quantification of 21 elements including priority pollutants and biologically essential elements (B, Mg, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Pd, Cd, Ba, La, Hg and Pb) in muscle and in the first spine of the first dorsal fin of albacore (*Thunnus alalunga*) and bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). A microwave assisted digestion has been developed for sample treatment, which has been evaluated using isotope dilution analysis (IDA) of Cr, Se, Cd, Ba and Pb. Evaluation of the analytical method in terms of sensitivity (LOQ between 0.002 and 1 mg kg<sup>-1</sup>), accuracy and precision within and between days (CV <11.3%) has also been conducted. The developed method has allowed information to be obtained on levels of these metals in both matrices. The correlation analyses performed for each of the metals in both matrices shows a positive linear relationship between the concentrations in muscle and fishbone for Zn, Se, Rb, Cd, As and Hg, which could be due to a higher bioaccumulation of these elements in muscle as it is concluded from the low spine/muscle ratios observed for these elements. The 34 specimens of tuna analyzed show that while the levels of Pb, Cd, Ni, Zn, Cu and Cr in muscle are below the limits set by the WHO/FAO, EC and the US-EPA, Hg shows higher concentration than the limits set by the EC in four samples, indicating a potential risk to human health.

Keywords: trace metals, tuna fish, muscle, fishbone, microwave assisted digestion, ICP-MS, isotope dilution analysis.

Accepted in **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**

## 1. Introduction

Metals are a large group of pollutants constituting a major environmental hazard due to their extensive use, toxicity and wide distribution. Therefore, interest in the determination of these contaminants in marine species has increased significantly in recent decades. Their presence in the environment is mainly due to anthropogenic pollution with industrial (mining, smelting and refining) and agricultural activities being the most important sources. Metals stay in the environment for long periods of time, which favors a higher dispersion and subsequent bioaccumulation and biomagnification. The concentration levels of metals in fish tissues are influenced by biotic and abiotic factors such as the habitat, the metal speciation [1], water temperature, pH and concentration of dissolved oxygen, and age, gender, body mass and the physiological conditions of the fish [2].

The environmental problems posed by the presence of metals in marine species are recognized by the World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization (FAO) which recommend maximum limits for Cd, Pb and Zn in fish [3]. Similarly, the Environmental Protection Agency (US-EPA) also sets limits for Pb, Cd, Hg, Ni, Zn, Cu and Cr in fish [4]. Furthermore, the European Commission has adopted a regulation [5], which establishes maximum levels of Pb, Cd and Hg in various fish species, including some species of tuna. In addition, the Commission recommends restrictions in the consumption of different species of fish, especially swordfish and tuna, by children, and pregnant or lactating mothers [6]. Table 1 shows the limits of metals in fish imposed by these agencies.

**Table 1.** Limits of metals in fish established by Regulation CE/629/2008, FAO and US-EPA.

Element	CE/629/2008	FAO	US-EPA
<b>Pb</b>	0.3 mg kg <sup>-1</sup> muscle meat of fish	0.5 mg kg <sup>-1</sup> fresh fish	4 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Cd</b>	0.1 mg kg <sup>-1</sup> muscle meat of tuna fish	0.5 mg kg <sup>-1</sup> fresh fish	0.2 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Hg</b>	1.0 mg kg <sup>-1</sup> muscle meat of tuna fish	-	0.5 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Ni</b>	-	-	1 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Zn</b>	-	30 mg kg <sup>-1</sup> fresh fish	-
<b>Cu</b>	-	30 mg kg <sup>-1</sup> fresh fish	120 mg kg <sup>-1</sup>
<b>Cr</b>	-	-	8 mg kg <sup>-1</sup>

Tuna are a group of teleost fish found at the top of the food chain, which includes species such as albacore (*Thunnus alalunga*), bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). This fish group is considered to have high performance and metabolism and a high feeding rate, which contributes to a significant accumulation of metals in its tissues [7,8]. Humans are exposed to these accumulated metals, and therefore also to their toxic effects, through consumption [9].

This bioaccumulation of metals in marine species occurs as a result of the constant interaction with the environment in which they feed and grow [10]. An example of this is the accumulation of inorganic compounds in calcified structures such as otoliths, which are often employed as indicators of pollution and climate variation [11-13]. However, the use of otoliths as bioindicators presents some disadvantages, since their extraction is tedious and requires sacrificing the fish. Tuna fish display hyaline rings in the first spine of the first dorsal fin that are related to the growth of young individuals as well as with their migratory movements [14,15]. Previous investigations indicated that the biomineral hydroxyapatite, the main component of fishbone, retains heavy metals from aqueous solutions either by sorption, surface complexation or coprecipitation [14,16,17]. Therefore, it is expected that, as happens in otoliths, the mineral phase of the spine incorporates the heavy metals to which the fish is exposed during its development. Moreover, the quantification of trace metals in the spine of the dorsal fin has some advantages; it is easy to sample and does not interfere with the market value of the fish.

To date, the methods developed for quantification of metals in fish have been based on techniques such as atomic absorption spectrometry (AAS) [18-24], graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) [7,25-30], cold vapor (for Hg) and hydride generation (for As) atomic absorption spectrometry (HGAAS) [31,32], inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) [33-41], instrumental neutron activation analysis (INAA) [42] and more recently inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [43-50]. The low concentration levels of metals found in these samples make ICP-MS a suitable technique for quantification, due to its high sensitivity and its ability to determine a wide range of metals and several non-metals at concentrations below the  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Samples are rarely in the right conditions for direct introduction to these analytical techniques, so a previous sample treatment procedure is usually required. In the case of fish muscle samples, wet acid digestion in a heating plate [19,34,37,40,49], ultrasound [22,27,28] and microwave assisted digestions [39,46,51] have been the most frequently used procedures. Usually, ultrasonic acid digestion involves the use of smaller volumes of acid and shorter analysis time compared with acid digestion in a heating plate [28]. However, there are studies that demonstrate the lack of efficiency in the extraction of certain metals by ultrasound assisted digestion [33], so the use of microwave accelerated reaction system (MARS) seems to be the best option.

In the case of calcareous structures such as otoliths, scales and fishbones, digestion with nitric acid has been the most widely used procedure [20,43-45,48]. Some authors have proposed a digestion in nitric acid overnight for otoliths and scales and of 36 hours for spines [45], while others have suggested an acid digestion of spines in a microwave oven with nitric acid and hydrogen peroxide [48]. The major drawback of the digestion of calcareous structures is the high concentration of Ca in the digestion solution, which hinders the quantification of minor elements. Moreover, this process leads to sample dilution resulting in the loss of sensitivity. In these cases, some authors proposed the use of a mini-column filled with a resin binder that allows the elimination of the interference and the preconcentration of the sample [43].

The main objective of this study was to develop and optimize an inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) based method, which allows the quantification of 21 elements in muscle and in the first spine of the first dorsal fin of albacore (*Thunnus alalunga*) and bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). The selection of the 21 elements was carried out taking into account the need to obtain information from three groups of elements, priority pollutants (Cd, Pb, Hg, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ba, Cr), emerging environmental pollutants (Pd, La, V) and biologically essential elements (B, Mg, Sr, Al, Mn, Fe, Co, Rb), which may be of interest in future studies of bioaccumulation. For sample treatment, microwave assisted acid digestion was chosen since it is an effective technique for total decomposition of the matrix minimizing contamination or losses of analytes and allowing the recovery of the most volatile elements. This method was applied to the analysis of 34 samples of muscle and spine. Additionally, the correlation between the concentration levels of metals quantified in both matrices was assessed, as well as the differences between the two tuna species.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Instrumentation**

In the preparation of the samples, an agate mortar was used for the grinding of the spines. For subsequent pulverization a Mikro Dismembrator II model B ball mill (Braun Biotech International, Germany) fitted with a Teflon<sup>TM</sup> container and balls of 10 mm diameter was used.

The weighing of samples, reagents and standards was performed on an analytical balance Ohaus Pioneer model PA114C (Pine Brook, USA). Standard solutions and samples were stored in polypropylene bottles from Azlon (Staffordshire, UK).

For acid digestion of samples a Speedwave® Four microwave oven (Berghof, Eningen, Germany) equipped with Teflon<sup>TM</sup> DAP-60 vessels was used. To facilitate the process of weighing and to avoid losses, the samples were weighed directly into Teflon<sup>TM</sup> microcapsules, which were then introduced into the sample vessels.

A 7500ce Series ICP-MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) was used in this work. A MicroMist micro-uptake glass concentric nebulizer at a 0.4 ml min<sup>-1</sup> flow rate (Glass Expansion, West Melbourne, Australia) and a double-pass Scott-type spray chamber were used to create the aerosol prior to introduction into the plasma. A Fassel type torch with an internal diameter of 2.5 mm was used. An ICP-MS ChemStation System G1834B software was used and operating conditions are shown in Table 2.



**Table 2.** ICP-MS operating conditions.

<b>RF power</b>	1500 W
<b>Plasma gas flow</b>	15 l min <sup>-1</sup>
<b>Make-up gas flow</b>	0.10 -0.16 l min <sup>-1</sup>
<b>Carrier gas flow</b>	0.90 l min <sup>-1</sup>
<b>He gas flow (colision cell)</b>	4.5 ml min <sup>-1</sup>
<b>Nebulizer</b>	MicroMist
<b>Spray chamber</b>	Double-pass Scott-type spray chamber (2 °C)
<b>Torch</b>	Fassel-type torch. 2.5 mm diameter
<b>Cones</b>	Ni
<b>Sampling depth</b>	6.5-7 mm
<b>Ion lens setting parameters</b>	
<i>Extraction lens 1</i>	2 V
<i>Extraction lens 2</i>	140 V
<i>Omega bias</i>	30 V
<i>Omega lens</i>	1 V
<i>Cell input</i>	34 V
<i>QP focus</i>	-12 V
<i>Cell output</i>	30 V
<i>Octopole RF</i>	150 V
<i>Octopole bias</i>	-18 V
<i>QP bias</i>	-16 V
<b>Integration time per mass</b>	300 ms
<b>Monitored isotopes</b>	<sup>10</sup> B, <sup>11</sup> B, <sup>24</sup> Mg, <sup>25</sup> Mg, <sup>26</sup> Mg, <sup>27</sup> Al, <sup>50</sup> V, <sup>51</sup> V, <sup>52</sup> Cr, <sup>53</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>56</sup> Fe, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu, <sup>66</sup> Zn, <sup>68</sup> Zn, <sup>75</sup> As, <sup>78</sup> Se, <sup>82</sup> Se, <sup>85</sup> Rb, <sup>86</sup> Sr, <sup>88</sup> Sr, <sup>89</sup> Y, <sup>105</sup> Pd, <sup>111</sup> Cd, <sup>114</sup> Cd, <sup>135</sup> Ba, <sup>137</sup> Ba, <sup>139</sup> La, <sup>140</sup> Ce, <sup>193</sup> Ir, <sup>199</sup> Hg, <sup>200</sup> Hg, <sup>201</sup> Hg, <sup>202</sup> Hg, <sup>206</sup> Pb, <sup>207</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb

## 2.2 Reagents and standards

All the laboratory material was thoroughly washed to minimize contamination. First it was soaked in 15% HNO<sub>3</sub> solution for 2-3 days and then rinsed 5 times with Milli-Q water. The material was then kept in double plastic bags prior to use.

For the daily optimization of ICP-MS operating conditions a solution of 1 µg l<sup>-1</sup> of six elements in 2% nitric acid supplied by Agilent Technologies (USA) was used, monitoring <sup>7</sup>Li, <sup>24</sup>Mg, <sup>59</sup>Co, <sup>89</sup>Y, <sup>140</sup>Ce and <sup>205</sup>Tl isotopes.

The monoelemental standards of the analytes (B, Mg, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Pd, Cd, Ba, La, Hg, Pb) and the internal standards (Y, Ce, Ir) of 1000 µg ml<sup>-1</sup> were supplied by SCP Science (Courtaboeuf Cedex, France). From the commercial standards, monoelemental standard solutions of 2 µg g<sup>-1</sup> were prepared. From these standards a multielemental 100 µg kg<sup>-1</sup> standard solution was obtained. In the same way, 10 µg g<sup>-1</sup> monoelemental standard solutions were also prepared for the internal standards, from which a 500 µg kg<sup>-1</sup> multielemental solution was carried out. All these solutions

were weighed on an analytical balance and prepared in 1% sub-boiling nitric acid distilled from analytical grade nitric acid (65%) of Merck (Germany) in a Teflon™ still (Savillex Corp., USA). The water used in this work was of Milli-Ro Plus quality obtained by purifying demineralized water in a Milli-Q water filtration system (Millipore, USA) and which was then stored in a container of high density polyethylene. All the standards were stored in refrigeration at 4 °C.

For isotope dilution analysis the samples were spiked with known amounts of enriched stable isotopes of Pb enriched in  $^{207}\text{Pb}$ , Cd enriched in  $^{111}\text{Cd}$ , Se enriched in  $^{77}\text{Se}$  and Cr enriched in  $^{53}\text{Cr}$  supplied by ISC-Science (Spain) and Ba enriched in  $^{135}\text{Ba}$  from Inorganic Ventures (USA).

### ***2.3 Samples***

Albacore is a seasonal product that is only captured during the summer months (From June to September) by the Cantabrian Sea coastal fleet (Gulf of Biscay) and rarely exceeds 12 kg of weight in adulthood. Bluefin tuna is captured in the North Atlantic or Newfoundland (Canada) and could weigh more than 50 kg. In the Spanish market albacore is consumed in greater quantities than bluefin tuna, and that is why a higher number of albacore samples have been selected in this study. The 34 samples of tuna (12 bluefin tuna and 22 albacore) analyzed in this study were obtained from various local fish shops during 2009. The procedure used to extract the spine was as follows: initially the first spine of the first dorsal fin was separated and the membrane between the first two spines was cut, then the spine was tilted forward and turned on itself, first in one direction and then in the other. Once extracted, the spines were washed with Milli-Ro water, air-dried and frozen at -42 °C on filter paper. Muscle samples were stored at -42 °C in polypropylene bottles.

### ***2.4 Sample treatment***

Before analysis, samples of spine were ground in an agate mortar and then powdered in a ball mill (12 hours). Muscle samples were chopped up with a disposable plastic knife previously cleaned as described above. Both samples of powdered bone and chopped muscle were weighed (approximately 0.3 g) in a Teflon™ microcapsule and introduced into the digestion vessel. Five milliliters of sub-soiled  $\text{HNO}_3$ : water (60:40) mixture were added ensuring full coverage of the samples. The digestion program parameters were those specified in Table 3. After cooling, samples were diluted to 15 g with Milli-Ro water. For the analysis, a final dilution of 1:10 and the addition of the internal standards were required. Due to the high concentrations of Sr and Mg in the spines the final dilution was 1:1000 for the analysis of these two elements.

**Table 3.** Microwave assisted digestion parameters.

Stage	T (°C)	P (Bar)	Ramp (min)	t (min)	Power (%)
1	160	30	5	10	80
2	180	30	5	10	85
3	190	30	3	15	90
4	50	0	1	1	0
5	50	0	1	1	0

\*The ramp time refers to the maximum time used to reach the temperature.

### ***2.5 Isotope dilution analysis procedures***

Isotope dilution analysis (IDA) is a well-known analytical technique based on the measurement of isotope ratios in a sample where isotopic composition has been altered by the addition of a known amount of an isotopically enriched element (spike). Subsequently, the isotopic ratios of the analyte in the mixture (sample + spike) are determined and the analyte concentration in the sample is calculated following a series of mathematical calculations [52].

For the pre-digestion IDA, about 0.3 g of a pool of chopped muscle samples and 0.3 g of another pool of pulverized spine samples were weighed. A volume of an enriched multielement spike solution (50.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of Cr enriched in  $^{53}\text{Cr}$ , 1012.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of Se enriched in  $^{77}\text{Se}$ , 28.2  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of Cd enriched in  $^{111}\text{Cd}$ , 665.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of Ba enriched in  $^{135}\text{Ba}$  and 42.3  $\mu\text{g kg}^{-1}$  of Pb enriched in  $^{207}\text{Pb}$ ) was added to each of them. Those five elements cover the entire mass range of the analytes of interest (from m/z 52 of Cr to m/z 208 of Pb) and similar behavior for the rest of the elements could be expected.

The concentrations in the enriched spike solution were selected based on a previous quantification by external calibration of the analytes in the samples and taking into account that the ratio between the amount of analyte and spike should not exceed 1:10 or 10:1. Finally, the spiked samples were then digested and diluted as previously described. For the post-digestion study, once the samples were digested and diluted, the enriched spike solution was diluted 1:500 and added to the samples so that the ratio between the amount of analyte and spike did not exceed 1:10 or 10:1.

## **3. Results and discussion**

### ***3.1 Effectiveness of sample treatment procedure***

Initially, and prior to the quantification of metals in the samples, IDA was used to evaluate the digestion procedure. This method allows the evaluation of possible analyte losses in the sample treatment because

once the equilibrium between the spike and the sample is reached, any loss or error in subsequent proceedings does not affect the isotopic ratios, resulting in greater precision and accuracy in analytical measurements. Therefore, and in order to study the effectiveness of the sample treatment method, the quantification by IDA was applied both before digestion (pre-digestion) and after it (post-digestion) and the results were compared.

As shown in Table 4, there are no significant differences between the results obtained by the addition of the spikes before and after digestion. When Student's t test were applied, the calculated t values were between 0.18 and 4.26, below the tabulated value ( $t_{\text{tab}}=4.30$ ;  $p<0.05$ ), which confirmed that there were no statistically significant differences. Therefore, it could be concluded that there was no contamination or loss of analytes and that the sample treatment procedure proposed in this work is effective for tuna fish muscle and spine samples.

**Table 4.** Concentrations ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) of metals in spines and muscle (wet weight) quantified by pre-digestion (PRE) and post-digestion (POST) isotope dilution analysis (n = 3).

		<b>Cr</b>	<b>Se</b>	<b>Cd</b>	<b>Ba</b>	<b>Pb</b>
		<b>Mean <math>\pm</math> CV(%)</b>	<b>Mean <math>\pm</math> CV(%)</b>	<b>Mean <math>\pm</math> CV(%)</b>	<b>Mean <math>\pm</math> CV(%)</b>	<b>Mean <math>\pm</math> CV(%)</b>
		<b>(<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>(<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>(<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>(<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>	<b>(<math>\mu\text{g kg}^{-1}</math>)</b>
<b>SPINE</b>	<b>PRE</b>	100.3 $\pm$ 5.9	734.6 $\pm$ 1.2	50.9 $\pm$ 1.9	1752.9 $\pm$ 3.3	69.5 $\pm$ 0.4
	<b>POST</b>	96.8 $\pm$ 4.0	737.8 $\pm$ 0.2	51.1 $\pm$ 4.9	1652.0 $\pm$ 0.3	65.5 $\pm$ 6.0
<b>MUSCLE</b>	<b>PRE</b>	65.1 $\pm$ 5.8	1505.0 $\pm$ 0.8	16.9 $\pm$ 1.7	123.5 $\pm$ 3.7	17.0 $\pm$ 3.1
	<b>POST</b>	68.2 $\pm$ 0.8	1560.4 $\pm$ 4.2	18.6 $\pm$ 5.9	122.6 $\pm$ 4.1	16.4 $\pm$ 4.1

### 3.2 Analytical assessment of the method

Once the effectiveness of the digestion process was verified, the quantification of the elements in tuna muscle and spine samples was carried out. Reliable quantification of the analytes was achieved using matrix-matched calibrations and  $^{89}\text{Y}$ ,  $^{140}\text{Ce}$  and  $^{193}\text{Ir}$  as internal standards. A pool of muscle or spine was used to match the matrix of the calibration standards to the samples. In Table 5 concentration ranges covered in the calibrations as well as slopes and correlation coefficients are shown. Acid digests were diluted 10 times to assess all the analytes except Mg and Sr in spines, for which acid digests were diluted 1:1000.

**Table 5.** Limits of quantification (LOQ), slope, correlation coefficient (r), added concentration ranges ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and intra- and inter-day precision results in spine and muscle (n=5).

	LOQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	SPINE					MUSCLE				
		Slope	r	Added conc. range ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Precision (CV)		Slope	r	Added conc. range ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Precision (CV)	
					Intra	Inter				Intra	Inter
<sup>11</sup> B	0.20	$5.98 \times 10^{-3}$	0.9980	2.0-30.0	10.9	3.7	$5.00 \times 10^{-3}$	0.9998	0.2-30.0	9.4	8.1
<sup>25</sup> Mg	0.10	$8.58 \times 10^{-3}$	0.9999	5.0-300.0 <sup>b</sup>	2.8	2.7	$4.44 \times 10^{-1}$	0.9999	0.2-30.0	4.0	4.8
<sup>27</sup> Al	1.00	$2.70 \times 10^{-2}$	0.9950	2.0-30.0	10.3	4.3	$2.62 \times 10^{-2}$	0.9997	3.0-30.0	1.4	4.8
<sup>51</sup> V	0.005	$4.32 \times 10^{-1}$	0.9998	0.50-30.0	6.5	3.2	$3.84 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01-30.0	3.5	4.3
<sup>52</sup> Cr	0.05	$4.99 \times 10^{-1}$	0.9645	0.05-30.0	5.3	3.1	$4.41 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01-30.0	3.2	7.8
<sup>55</sup> Mn	0.05	$4.61 \times 10^{-1}$	0.9989	4.0-30.0	6.9	0.7	$4.09 \times 10^{-1}$	1.0000	0.05-30.0	2.8	4.4
<sup>56</sup> Fe	1.00	a	-	-	-	-	$4.56 \times 10^{-1}$	0.9994	3.0-30.0	3.1	4.2
<sup>59</sup> Co	0.002	$6.77 \times 10^{-1}$	0.9992	0.02-30.0	7.8	2.4	$6.33 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01-30.0	0.6	6.1
<sup>60</sup> Ni	0.05	a	-	-	-	-	$1.54 \times 10^{-1}$	1.0000	0.05-30.0	11.3	5.2
<sup>63</sup> Cu	0.05	$4.01 \times 10^{-1}$	0.9714	0.08-30.0	2.7	4.4	$3.79 \times 10^{-1}$	1.0000	0.05-30.0	1.1	3.1
<sup>66</sup> Zn	0.20	$7.36 \times 10^{-2}$	0.9997	10.0-300.0	3.3	4.5	$7.01 \times 10^{-2}$	0.9986	10.0-30.0	1.0	8.8
<sup>75</sup> As	0.005	$6.21 \times 10^{-2}$	0.9999	0.50-30.0	8.1	1.6	$5.60 \times 10^{-2}$	1.0000	3.0-30.0	5.5	1.8
<sup>82</sup> Se	0.20	$4.01 \times 10^{-3}$	1.0000	0.8-30.0	6.4	8.4	$4.09 \times 10^{-3}$	1.0000	1.0-30.0	4.8	4.6
<sup>85</sup> Rb	0.002	$5.06 \times 10^{-1}$	1.0000	0.05-30.0	3.7	1.4	$4.85 \times 10^{-1}$	1.0000	1.0-30.0	3.7	1.3
<sup>88</sup> Sr	0.20	$7.14 \times 10^{-2}$	0.9999	1.0-300.0 <sup>b</sup>	2.3	2.6	$6.27 \times 10^{-1}$	1.0000	1.0-30.0	0.1	1.6
<sup>105</sup> Pd	0.02	$1.46 \times 10^{-1}$	0.9995	0.10-30.0	0.1	8.4	$2.10 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01-30.0	1.7	7.2
<sup>111</sup> Cd	0.02	$1.01 \times 10^{-1}$	0.9993	0.03-30.0	1.9	9.6	$1.10 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01-30.0	2.5	6.7
<sup>137</sup> Ba	0.01	$9.39 \times 10^{-2}$	1.0000	2.0-30.0	5.2	1.5	$5.45 \times 10^{-2}$	1.0000	0.2-30.0	5.1	7.4
<sup>139</sup> La	0.005	$1.72 \times 10^{+0}$	0.9988	0.005-30.0	1.5	7.1	$9.54 \times 10^{-1}$	1.0000	0.01-30.0	8.1	7.8
<sup>201</sup> Hg	0.01	$2.63 \times 10^{-2}$	0.9986	0.01-30.0	5.3	9.4	$3.43 \times 10^{-2}$	0.9997	0.05-30.0	1.0	4.1
<sup>208</sup> Pb	0.01	$1.61 \times 10^{+0}$	0.9997	0.03-30.0	6.1	3.0	$1.40 \times 10^{+0}$	1.0000	0.01-30.0	0.6	5.9

<sup>a</sup>Since the major component of fishbone is hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), calcium concentration in the matrix is very high, around 20%. The combination of calcium atoms with oxygen and hydrogen in the plasma generates intense spectral interferences ( $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$  in  $^{56}\text{Fe}$ ,  $^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$  in  $^{57}\text{Fe}$ ,  $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$  and  $^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}$  in  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$  in  $^{61}\text{Ni}$ , among others). This prevents the quantification of Fe and Ni in spine samples.

<sup>b</sup>Calibration carried out in a pool of spines digested and diluted 1:1000.

The limit of quantification, defined as the lowest concentration of analyte that can be determined with an acceptable level of accuracy and precision, was calculated according to the guidelines established by the European Union [53] as the minimum concentration of the calibration curve for which the coefficient of variation is lower than 20% and the accuracy is 70-120%. In the absence of an analyte free matrix, these values were calculated for a standard solution prepared in 1% sub-boiling nitric acid (Table 5).

The accuracy of the method was assessed by analysis (n=5) of a reference material (NIST SRM 1486 Bone Meal), since this matrix requires harder digestion conditions in which the total digestion of muscle samples is guaranteed. The mean accuracy and standard deviation obtained were  $95.96 \pm 2.24\%$

for Mg,  $85.25 \pm 1.43$  % for Zn,  $105.81 \pm 2.32$  % for Sr and  $102.56 \pm 7.75$  % for Pb. The precision of the method was assessed by repeatedly analysing a pool of spine and a pool of muscle several times on the same day and on different days (Table 5). Results fell within the accepted ranges specified by the FDA [54].

### 3.3 Application to real samples

The developed method was applied to the analysis of tuna fish muscle and the first spine of the first dorsal fin samples of albacore (*Thunnus alalunga*) and bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) (Tables 6 and 7). Muscle mean concentrations of the legislated metals did not exceed the limits set by the WHO/FAO, US-EPA and the European Commission in any case. The highest concentrations found in muscle were  $0.03 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $0.02 \text{ mg kg}^{-1}$  for Cd and  $0.04 \text{ mg kg}^{-1}$  and  $0.03 \text{ mg kg}^{-1}$  for Pb in albacore and bluefin tuna, respectively. However, it is noteworthy that four of the albacore muscle samples exceeded the maximum concentration permitted by the EC for Hg concentration ( $1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and two more exceeded the limit established by the US-EPA ( $0.5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) with the highest concentration being  $1.4 \text{ mg kg}^{-1}$ . In bluefin tuna four muscle samples also exceeded this US-EPA limit and the maximum concentration was  $0.9 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Analysis of mean values in muscle for Mg, Mn, Fe, Co, Cu, Cd and As were found to coincide with mean values previously reported by Hellou et al. [55]. Al ( $0.4 \text{ mg kg}^{-1}$ ), Zn ( $6 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and Se ( $0.8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) registered lower values than in this study, while Hg ( $1.29 \text{ mg kg}^{-1}$ ) revealed a clearly higher value, although in the aforementioned study only *Thunnus thynnus* was analysed.

The coefficient of variation (CV) of each metal between the samples varied from 6.3 to 130.9% (Tables 6 and 7). This variation was more noticeable on the elements present at lower concentrations. Regarding the comparison of metal concentrations in albacore and bluefin tuna muscle, except for Ba, there were no significant differences, which would be expected for elements whose presence in the organism depends on the physiology of the fish. However, in regard to spine samples, the Student's t test showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) for V, Cr, Mn, Co, Cu, Se, Sr, Pd and La between the two tuna fish species studied. This could be explained by the different habitats and migration habits of albacore and bluefin tuna which may suggest the concentration of V, Cr, Mn, Co, Cu, Se, and La in spine is more influenced by the characteristics of the environment. However, in accordance with previous studies [56], the differences in Sr concentrations in marine fishes is not only due to water chemistry, but also due to other factors such as physiological processes and food.

**Table 6.** Mean concentrations ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), standard deviation, maximum and minimum levels of the analyzed elements in tuna muscle (wet weight) and first dorsal spine of albacore. Pearson correlation coefficient (R) between spine and muscle concentrations and the corresponding Student's t value (sample number: 22).

Element	SPINE				MUSCLE				Pearson correlation	
	Mean ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	CV (%)	Max ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Min ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Mean ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	CV (%)	Max ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Min ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Coefficient (R)	Student's t value <sup>a</sup>
<sup>11</sup> B	4.6	26.7	8.3	3.1	0.44	64.1	1.3	0.20	0.14	0.74
<sup>25</sup> Mg	2834	12.1	3230	2011	288	13.4	359	214	-0.18	0.99
<sup>27</sup> Al	3.6	31.2	6.2	2.1	1.9	50.0	4.2	1.0	-0.07	0.37
<sup>51</sup> V	0.35	29.9	0.52	0.16	0.004	32.3	0.010	0.002	0.25	1.37
<sup>52</sup> Cr	0.12	57.1	0.31	0.05	0.02	16.2	0.03	0.02	-0.12	0.66
<sup>55</sup> Mn	9.7	23.7	13.6	5.6	0.10	13.5	0.12	0.08	0.10	0.56
<sup>56</sup> Fe					7.3	41.3	16.2	3.7	-	-
<sup>59</sup> Co	0.09	25.3	0.16	0.06	0.005	21.6	0.01	0.004	-0.21	1.14
<sup>60</sup> Ni					0.04	58.6	0.14	0.02	-	-
<sup>63</sup> Cu	0.86	42.7	1.8	0.40	0.51	14.4	0.71	0.42	-0.20	1.10
<sup>66</sup> Zn	69.7	26.5	128	38.4	15.3	68.3	41.0	6.7	0.46	2.76
<sup>75</sup> As	0.73	42.0	1.5	0.27	1.5	26.6	2.2	0.83	0.31	1.73
<sup>82</sup> Se	0.57	25.7	1.1	0.35	1.2	22.0	1.8	0.87	-0.19	1.01
<sup>85</sup> Rb	0.20	20.5	0.32	0.15	0.55	13.8	0.67	0.33	0.33	1.83
<sup>88</sup> Sr	675	12.9	874	505	0.62	25.2	0.95	0.36	0.19	1.01
<sup>105</sup> Pd	1.21	9.6	1.38	0.95	0.02	6.3	0.02	0.02	0.22	1.19
<sup>111</sup> Cd	0.05	37.8	0.09	0.02	0.01	49.9	0.03	0.004	0.42	2.48
<sup>137</sup> Ba	1.6	49.3	3.7	1.0	0.13	110.4	0.52	0.02	0.28	1.54
<sup>139</sup> La	0.04	130.9	0.15	0.003	0.01	51.9	0.01	0.002	0.14	0.75
<sup>201</sup> Hg	0.10	59.7	0.28	0.05	0.48	71.2	1.3	0.22	0.88	9.92
<sup>208</sup> Pb	0.25	60.6	0.60	0.04	0.02	39.6	0.04	0.01	-0.01	0.04

<sup>a</sup>The tabulated Student's t values for the different significance levels were: 1.72 ( $p < 0.1$ ), 2.09 ( $p < 0.05$ ) and 2.53 ( $p < 0.01$ ) ( $n = 22$ ).

**Table 7.** Mean concentrations ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), standard deviation, maximum and minimum levels of the analyzed elements in tuna muscle (wet weight) and first dorsal spine of bluefin tuna. Pearson correlation coefficient (R) between spine and muscle concentrations and the corresponding Student's t value (sample number: 12).

Element	SPINE				MUSCLE				Pearson correlation	
	Mean ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	CV (%)	Max ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Min ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Mean ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	CV (%)	Max ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Min ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	Coefficient (R)	Student's t value
<sup>11</sup> B	6.1	42.4	12.1	3.3	0.55	38.0	0.88	0.28	0.23	1.23
<sup>25</sup> Mg	2720	11.1	3244	2194	305	16.2	388	250	-0.17	0.91
<sup>27</sup> Al	4.8	49.9	9.1	2.7	2.1	53.2	4.04	0.74	0.06	0.33
<sup>51</sup> V	0.25	32.2	0.38	0.14	0.005	35.8	0.008	0.003	0.27	1.51
<sup>52</sup> Cr	0.06	47.9	0.13	0.03	0.03	21.6	0.04	0.02	-0.37	2.08
<sup>55</sup> Mn	6.6	40.1	11.2	3.81	0.09	18.9	0.11	0.06	0.02	0.10
<sup>56</sup> Fe					8.4	21.6	11.8	6.1	-	-
<sup>59</sup> Co	0.07	21.9	0.10	0.04	0.005	18.4	0.006	0.003	0.16	0.85
<sup>60</sup> Ni					0.05	67.3	0.14	0.03	-	-
<sup>63</sup> Cu	0.59	32.5	1.07	0.39	0.49	15.9	0.66	0.39	0.17	0.91
<sup>66</sup> Zn	61.5	26.2	85.5	42.7	16.9	70.0	40.9	5.1	0.10	0.56
<sup>75</sup> As	0.85	60.4	1.7	0.28	1.2	42.1	2.1	0.56	0.36	2.02
<sup>82</sup> Se	0.79	37.0	1.4	0.42	1.5	35.1	2.3	0.58	0.55	3.44
<sup>85</sup> Rb	0.19	22.3	0.29	0.14	0.56	11.9	0.65	0.45	0.37	2.13
<sup>88</sup> Sr	584	13.6	725	459	0.61	40.4	1.0	0.16	-0.04	0.22
<sup>105</sup> Pd	1.03	31.8	1.4	0.40	0.02	9.5	0.03	0.02	0.12	0.66
<sup>111</sup> Cd	0.05	37.7	0.08	0.03	0.01	35.7	0.02	0.008	0.30	1.85
<sup>137</sup> Ba	1.8	38.6	3.6	1.2	0.05	37.2	0.09	0.03	0.12	0.65
<sup>139</sup> La	0.14	54.9	0.25	0.003	0.008	78.7	0.024	0.003	0.11	0.58
<sup>201</sup> Hg	0.11	39.9	0.18	0.05	0.52	45.1	0.90	0.24	0.89	10.3
<sup>208</sup> Pb	0.18	104.1	0.65	0.03	0.02	20.7	0.03	0.01	-0.02	0.13

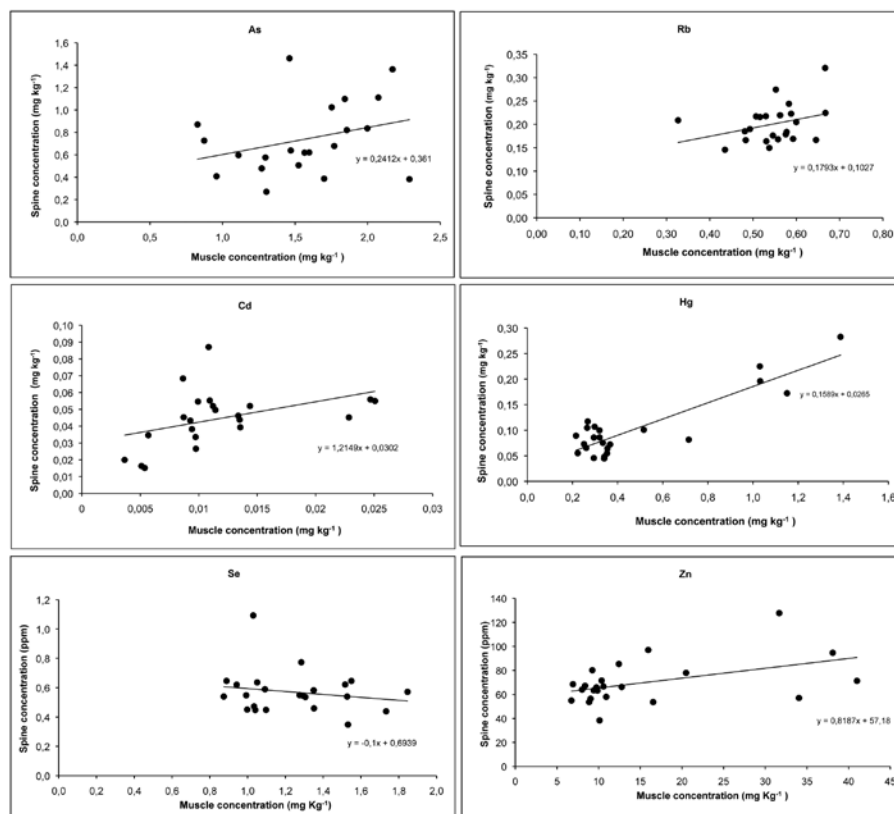
<sup>a</sup>The tabulated Student's t values for the different significance levels were: 1.81 ( $p < 0.1$ ), 2.23 ( $p < 0.05$ ) and 2.76 ( $p < 0.01$ ) ( $n=12$ ).

As concentrations in spines and muscles of the same fish are not necessarily independent observations, a paired-t test was used to study the differences between the spine and muscle concentrations. The Student's paired-t test showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) for most of the analytes; the bioaccumulation in spine being stronger than in muscle. The observed concentrations of Sr and Mg in spine were well above those determined in muscle. The reason is that hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), the major component of fishbone, has an ionic character that gives the molecule the ability to substitute ions from its network with similar size ions ( $\text{Ca}^{2+}$  with  $\text{Sr}^{2+}$  or  $\text{Mg}^{2+}$ ). Furthermore, it is noticeable that the concentrations of As, Se, Rb and Hg in muscle were higher than in the spine, which has been previously observed for Hg and Se in scales [57].

Possible associations between the concentration values in muscle and in the first spine of the first dorsal fin were explored and a correlation analysis was performed for each metal. After verifying normal distribution of the results, the Pearson correlation coefficient (R), which measures the linear relationship between two quantitative random variables, and the corresponding Student-t values were



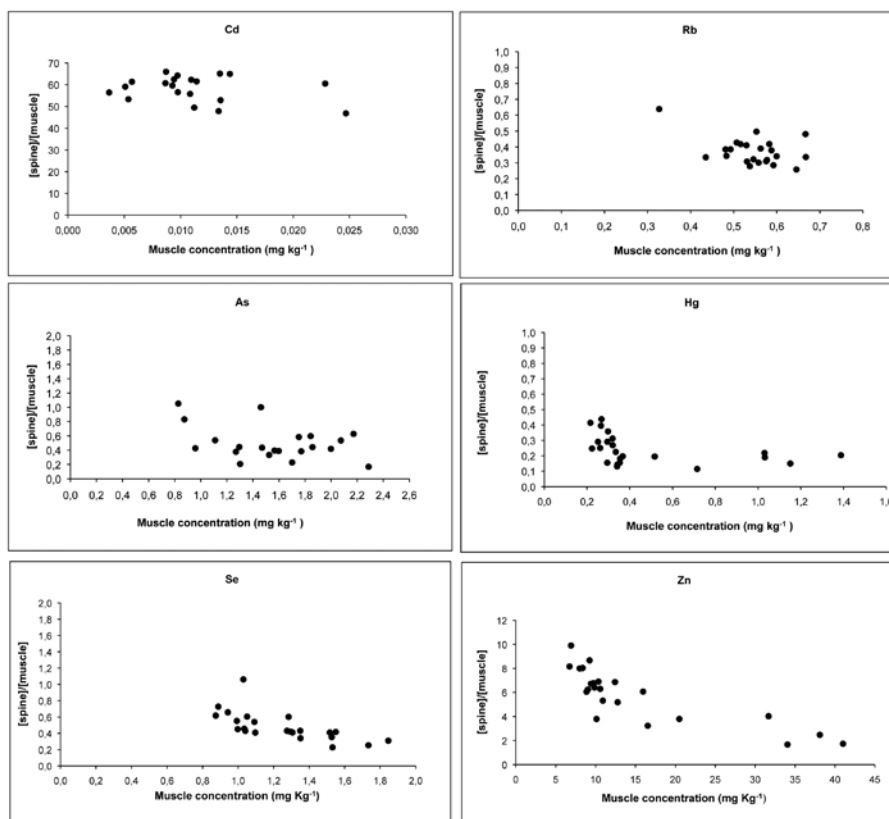
calculated (Tables 6 and 7). These results show a positive linear correlation between muscle and first spine of the first dorsal fin for Cd, As, Rb and Hg in both species. Besides, Zn and Se were positively linearly correlated in albacore and bluefin tuna, respectively. This positive correlation indicates that there is also an accumulation of these elements in muscle. This affirmation is in accordance with the higher muscle concentrations observed for As, Se, Rb and Hg compared with the ones in spine. Corresponding dispersion diagrams allowed for further understanding of the relationship between the two variables (Figure 1).



**Figure 1.** Dispersion diagrams for As, Rb, Cd, Hg, Se and Zn in muscle and spine of albacore.

In other cases, such as those previously mentioned for Mg and Sr, the influence of the hydroxyapatite matrix was so evident that spine concentration could not be used for the estimation of the concentration in the muscle. For the other metals there was no evidence of linear correlation and it could be concluded that both variables are independent. This could be due to different reasons such as the narrow concentration range and the absence of strict quantitative relationships. To check the latter possibility, the spine to muscle metal concentration ratios were calculated and compared with concentrations in muscle (Figure 2). A spine-to-muscle constant ratio independent of the muscle concentration indicates a correlation between both matrices. These representations did not show constant ratios for the elements for which no correlation was previously observed with the Pearson correlation coefficient. It is noteworthy that As, Rb and Cd spine-to-muscle ratio values were more

homogeneous, which supports the positive linear correlation between spine and muscle for these elements. However, for Zn, Se and Hg, the spine-to-muscle ratios were higher at lower muscle concentrations, which indicates that the accumulation of these elements in spine occurs to a greater extent at low muscle concentrations and that the linear correlation could only be affirmed for higher concentrations.



**Figure 2.** Relationship for spine-to-muscle ratio and muscle concentration for As, Rb, Cd Hg, Se and Zn in albacore.

#### 4. Conclusions

The developed analytical method enabled the quantification of a total of 21 elements (B, Mg, Al, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Rb, Sr, Pd, Cd, Ba, La, Hg, Pb) by ICP-MS in tuna fish dorsal spine and muscle after acid digestion in microwave oven in a sensitive and accurate way. The effectiveness of the digestion procedure was supported by evaluation using isotope dilution analysis.

This method was applied for the quantification of metals in muscle and in the first spine of the first dorsal fin of a total of 34 samples of albacore and bluefin tuna. Concentrations of Pb, Cd, Ni, Zn, Cu and Cr obtained from muscle samples were below the limits set by the WHO/FAO, EC and the US-

EPA. However, ten muscle samples had Hg concentrations higher than those set by the US-EPA, and four of them were above the limits established by the EC, indicating a potential risk to human health.

The Pearson correlation analysis and the representation of the spine to muscle metal concentration ratios *vs* the muscle concentrations led to the conclusion that there is a linear relationship between concentrations in muscle and first spine of the first dorsal fin for Zn, As, Rb, Cd and Hg in albacore and for As, Rb, Cd, Hg and Se, for bluefin tuna. Furthermore, concentrations of As, Se, Rb and Hg in muscle were higher than in spine, which suggests that the linear positive correlation between muscle and first dorsal spine could be due to a higher bioaccumulation of these elements in muscle.

### **Acknowledgements**

A.U. acknowledges the Spanish Ministry of Education for partial financial support under a mobility grant TME 2009-00777 and the Research Office of UPV/EHU for her pre-doctoral grant. Technical and human support provided by Alava Central Service of Analysis, SGIker (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, ESF, FEDER) is gratefully acknowledged.

## References

- [1] A. Ugarte, N. Unceta, M.C. Sampedro, M.A. Goicolea, A. Gómez-Caballero, and R.J. Barrio, *J. Anal. At. Spectrom.* **24**, 347 (2009).
- [2] M.I. Castro-Gonzalez, and M. Mendez-Armenta, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **26**, 263 (2008).
- [3] FAO/OMS, FAO fishery circular **464**, 5 (1983).
- [4] US-EPA, Methods for Chemical Analysis of Water and Waste. EPA-600/4-79-020, US-EPA. Environmental Services Division, Cincinnati, 1983.
- [5] European-Commission, Official Journal of the European Union L 173/6 (2008).
- [6] European-Commission, Information note: methylmercury in fish and fishery products. D/530286, Health and Consumers Directorate-General, Brussels, 2008.
- [7] M.M. Storelli, R. Giacomini-Stuffler, A. Storelli, and G.O. Marcotrigiano, *Mar. Pollut. Bull.* **50**, 1004 (2005).
- [8] J. Engman, and L. Jorhem, *Food Addit. Contam.* **15**, 884 (1998).
- [9] S.W.C. Chung, K.P. Kwong, J.C.W. Yau, and W.W.K. Wong, *Food Addit. Contam.* **25**, 831 (2008).
- [10] P.T.P. Tsui, and P.J. McCart, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **10**, 277 (1981).
- [11] M.M. Ranaldi, and M.M. Gagnon, *Water. Air. Soil Pollut.* **194**, 31 (2008).
- [12] J. Yoshinaga, M. Morita, and J.S. Edmonds, *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1589 (1999).
- [13] K. Zumholz, A. Kluegel, T. Hansteen, and U. Piatkowski, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **333**, 195 (2007).
- [14] M. Das, *Gerontology* **40**, 70 (1994).
- [15] P. Megalofonou, and G. De Metrio, *J. Mar. Biol. Assoc. UK.* **80**, 753 (2000).
- [16] X. Chen, J.V. Wright, J.L. Conca, and L.M. Peurrung, *Environ. Sci. Technol.* **31**, 624 (1997).
- [17] M.-H. Chen, C.-C. Shih, C.L. Chou, and L.-S. Chou, *Mar. Pollut. Bull.* **45**, 237 (2002).
- [18] M. Canli, and G. Atli, *Environ. Pollut.* **121**, 129 (2002).
- [19] K. Das, G. Lepoint, V. Loizeau, V. Debacker, P. Dauby, and J.M. Bouqueneau, *Mar. Pollut. Bull.* **40**, 102 (2000).
- [20] L.T. Kovekovdova, and M.V. Simokon, *Russ. J. Mar. Biol.* **28**, 113 (2002).
- [21] F. Kucuksezgin, E. Uluturhan, A. Kontas, and O. Altay, *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 827 (2002).
- [22] N. Manutsewee, W. Aeungmaitrepirom, P. Varanusupakul, and A. Imyim, *Food Chem.* **101**, 817 (2006).
- [23] S.M.M. Nakayama, Y. Ikenaka, K. Muzandu, K. Choongo, B. Oroszlany, H. Teraoka, N. Mizuno, and M. Ishizuka, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **59**, 291 (2010).
- [24] T.V. Sankar, A.A. Zynudheen, R. Anandan, and P.G.V. Nair, *Chemosphere* **65**, 583 (2006).
- [25] M.H. Al-Yousuf, M.S. El-Shahawi, and S.M. Al-Ghais, *Sci. Total Environ.* **256**, 87 (2000).
- [26] P.-A. Amundsen, F.J. Staldvik, A. Lukin, N. Kashulin, O.A. Popova, and Y.S. Reshetnikov, *Sci. Total Environ.* **201**, 211 (1997).
- [27] J. Burger, and M. Gochfeld, *Environ. Res.* **99**, 403 (2005).
- [28] T.G. Kazi, M.K. Jamali, M.B. Arain, H.I. Afridi, N. Jalbani, R.A. Sarfraz, and R. Ansari, *J. Hazard. Mater.* **161**, 1391 (2009).
- [29] P. Licata, D. Trombetta, M. Cristani, C. Naccari, D. Martino, M. Calo, and F. Naccari, *Environ. Monit. Assess.* **107**, 239 (2005).
- [30] M. Tuzen, *Food Chem.* **80**, 119 (2002).
- [31] F. Emami Khansari, M. Ghazi-Khansari, and M. Abdollahi, *Food Chem.* **93**, 293 (2005).
- [32] P. Sivaperumal, T.V. Sankar, and P.G.V. Nair, *Food Chem.* **102**, 612 (2007).
- [33] S. Canepari, E. Cardarelli, S. Ghighi, and L. Scimonelli, *Talanta* **66**, 1122 (2005).
- [34] B. Ersoy, Y. Yanar, A. Kuecukguelmez, and M. Celik, *Food Chem.* **99**, 748 (2006).
- [35] A. Meche, M.C. Martins, B.E.S.N. Lofrano, C.J. Hardaway, M. Merchant, and L. Verdade, *Microchem. J.* **94**, 171 (2010).
- [36] J.C. Moss, C.J. Hardaway, J.C. Richert, and J. Sneddon, *Microchem. J.* **95**, 5 (2010).
- [37] M. Tuerkmen, and C. Ciminli, *Food Chem.* **103**, 670 (2007).
- [38] K. Uysal, Y. Emre, and E. Kose, *Microchem. J.* **90**, 67 (2008).

- [39] Z. Visnjic-Jeftic, I. Jaric, L. Jovanovic, S. Skoric, M. Smederevac-Lalic, M. Nikcevic, and M. Lenhardt, *Microchem. J.* **95**, 341 (2010).
- [40] F. Yilmaz, N. Oezdemir, A. Demirak, and A.L. Tuna, *Food Chem.* **100**, 830 (2006).
- [41] US-EPA, Determination of Metals in Fish Tissue by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. EPA Method 200.11, revision 1.3, US-EPA. Office of research and development and environmental monitoring and support laboratory, Cincinnati, 1987.
- [42] J.H. Zaidi, I.H. Qureshi, M. Arif, and I. Fatima, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **60**, 15 (1995).
- [43] Z. Arslan, and D.H. Secor, *Mar. Environ. Res.* **66**, 364 (2008).
- [44] S.G. Dove, B.M. Gillanders, and M.J. Kingsford, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **205**, 15 (1996).
- [45] B.M. Gillanders, *Fish. Bull.* **99**, 410 (2001).
- [46] F.J.S. Lopez, M.D.G. Garcia, N.P.S. Morito, and J.L.M. Vidal, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **54**, 223 (2003).
- [47] C. Shinn, F. Dauba, G. Grenouillet, G. Guenard, and S. Lek, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **72**, 1957 (2009).
- [48] B. Staniskiene, P. Matusевичius, R. Budreckiene, and K.A. Skibniewska, *Pol. J. Environ. Stud.* **15**, 585 (2006).
- [49] US-EPA, Sample preparation procedure for spectrochemical determination of total recoverable elements in biological tissues. EPA Method 200.3., US-EPA: Environmental Services Division, Cincinnati, 1991.
- [50] J.J. Vicente-Martorell, M.D. Galindo-Riano, M. Garcia-Vargas, and M.D. Granado-Castro, *J. Hazard. Mater.* **162**, 823 (2009).
- [51] B. Bocca, M.E. Conti, A. Pino, D. Mattei, G. Forte, and A. Alimonti, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **87**, 1111 (2007).
- [52] P. Rodriguez-Gonzalez, J.M. Marchante-Gayon, J.I. Garcia Alonso, and A. Sanz-Medel, *Spectrochim. Acta, Part B* **60B**, 151 (2005).
- [53] SANCO/10684/2009, Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.  
"[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf)"
- [54] FDA, Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation.  
"<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>"
- [55] J. Hellou, L.L. Fancey, and J.F. Payne, *Chemosphere* **24**, 211 (1992).
- [56] R.J. Brown, and K.P. Severin, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **66**, 1790 (2009).
- [57] A.P. Farrell, A.H. Hodaly, and S. Wang, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **39**, 515 (2000).

# Anexo: Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras de bonito (*Thunnus alalunga*) analizadas

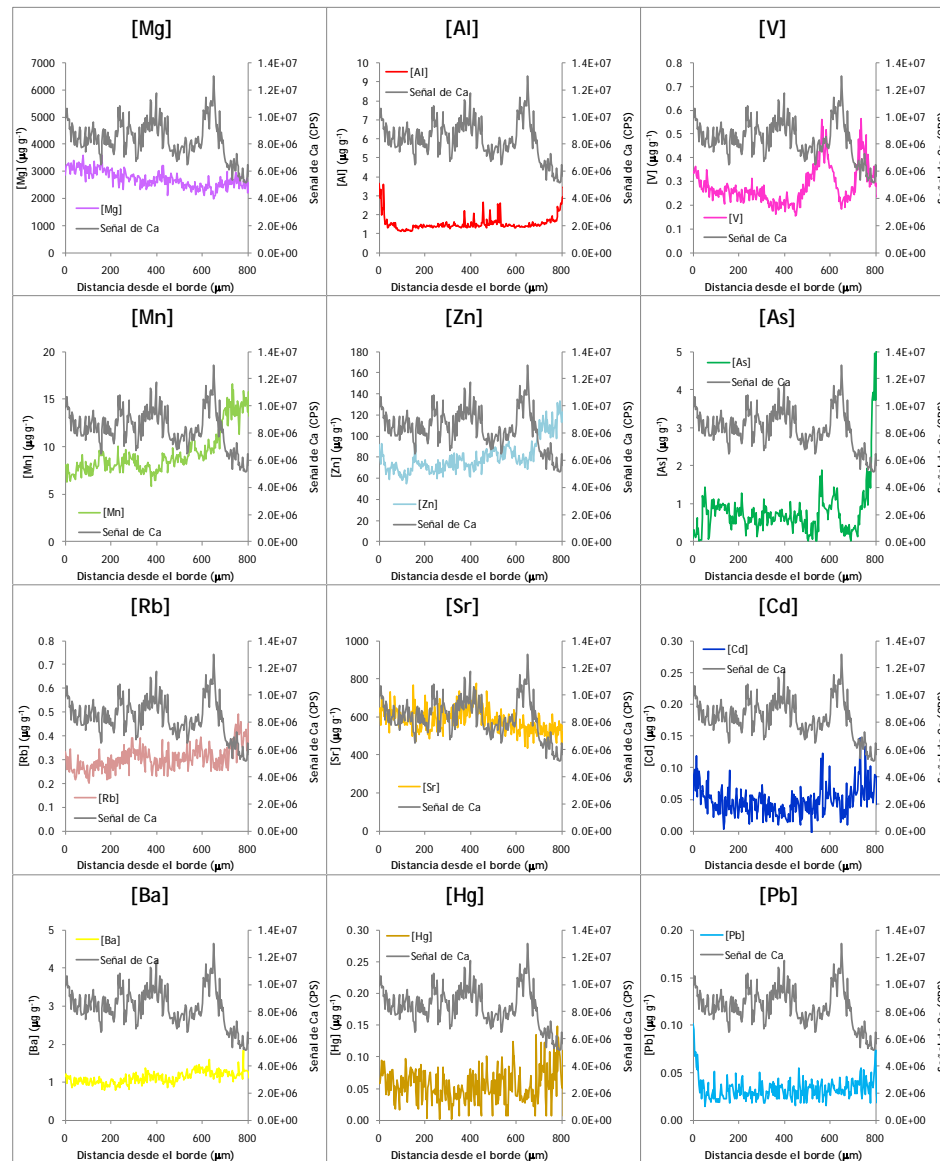
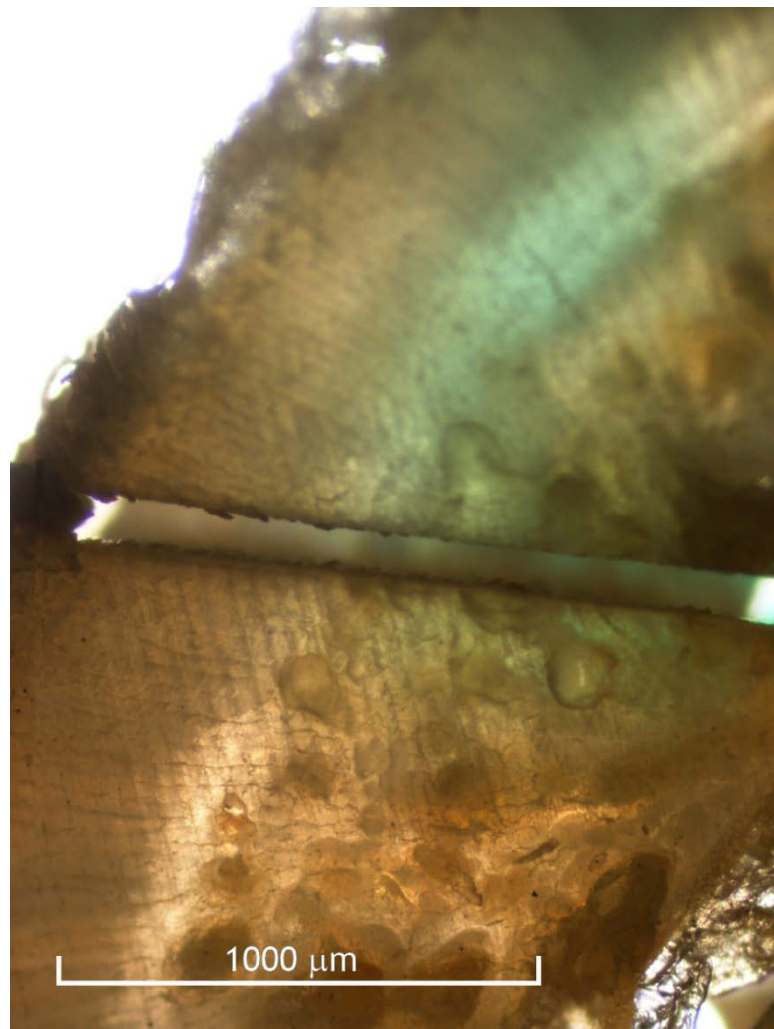
Development of new applications of inductively  
coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)  
hyphenated with different sample introduction  
systems

Ana Ugarte Baztan  
2011

Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

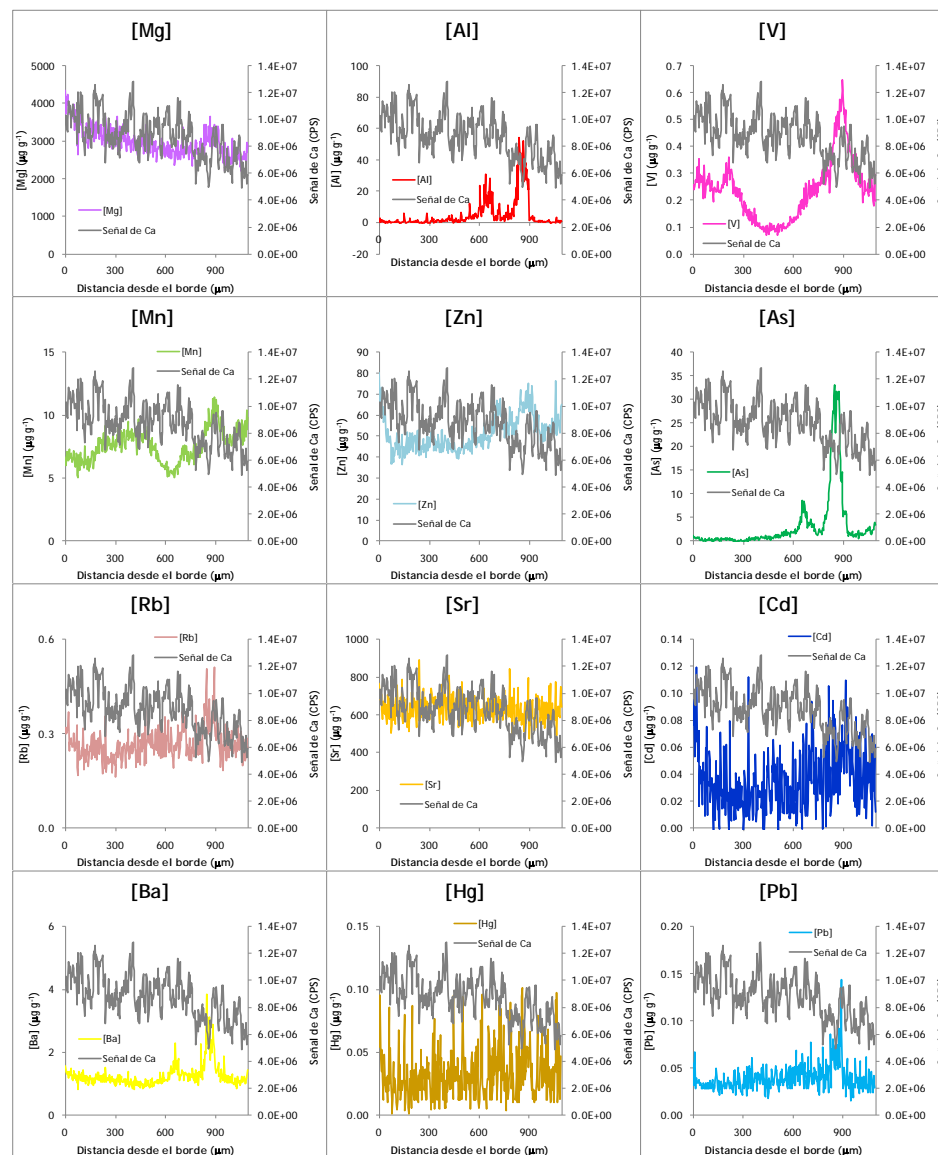
### Muestra A



Anexo:

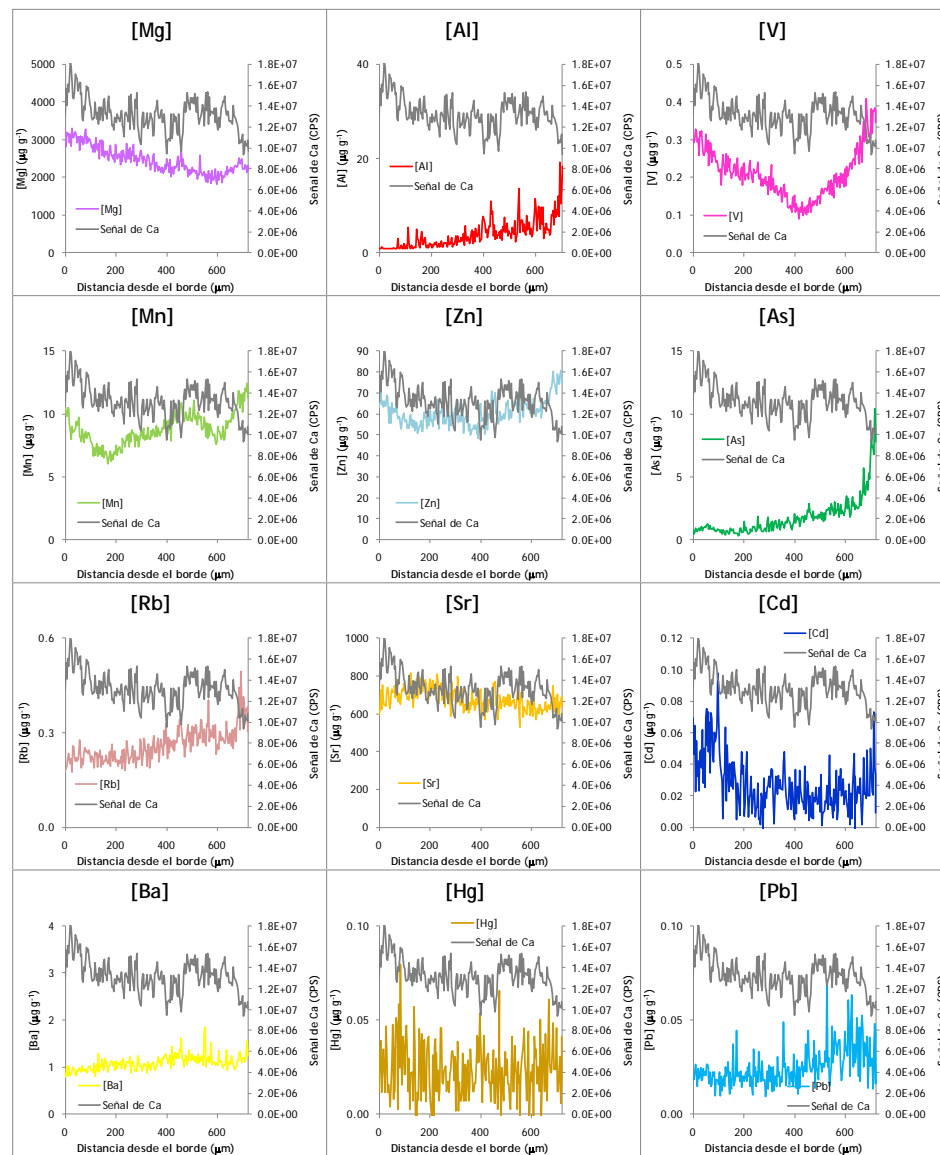
Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

## Muestra B





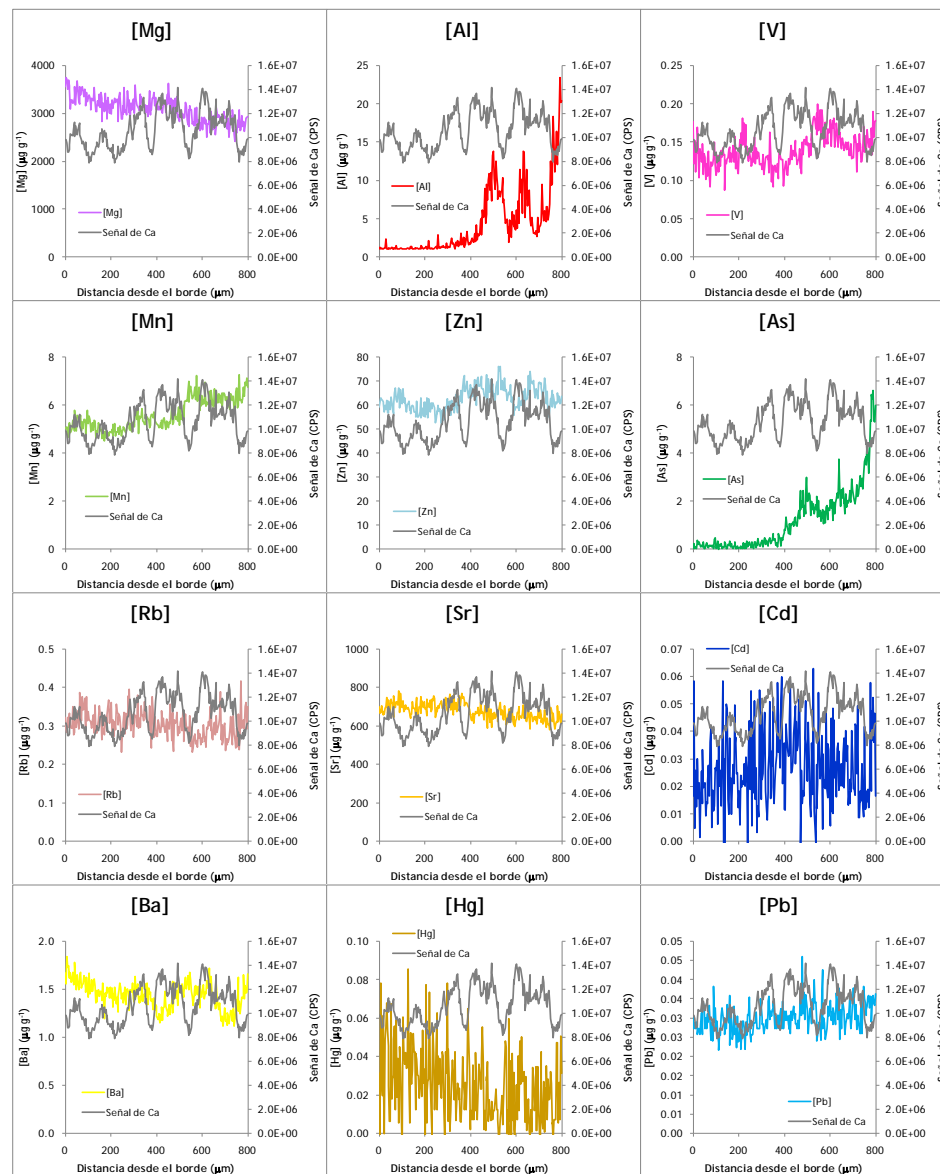
## Muestra C



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

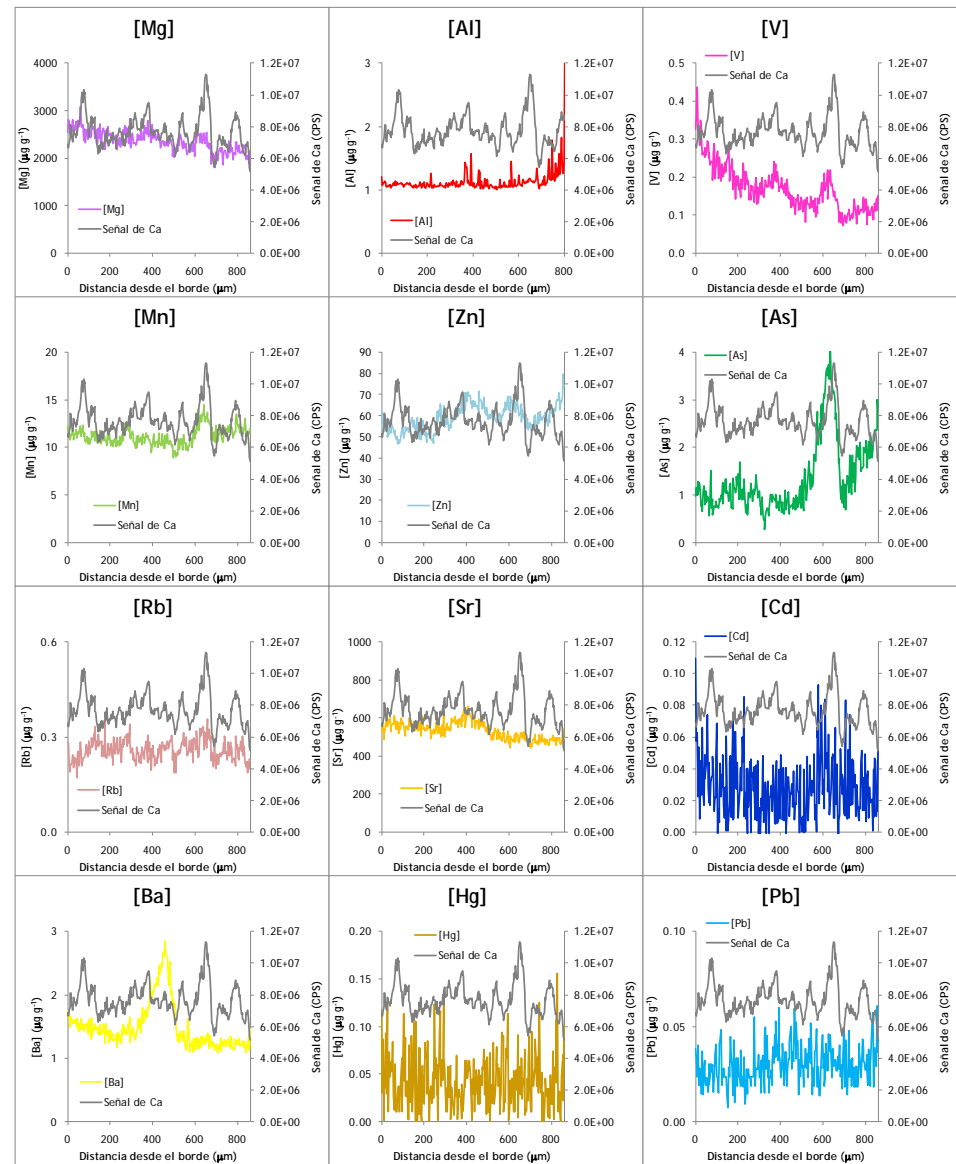
## Muestra D



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

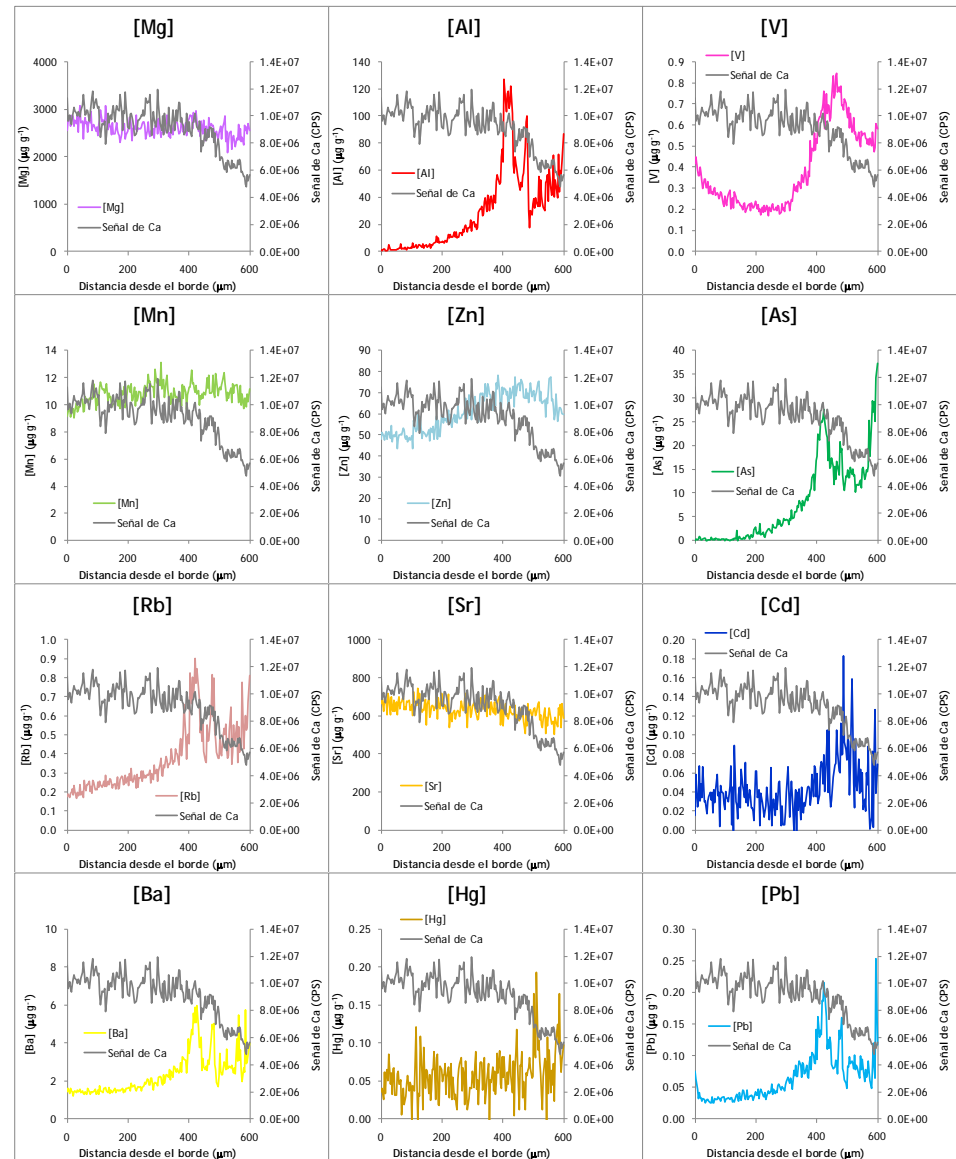
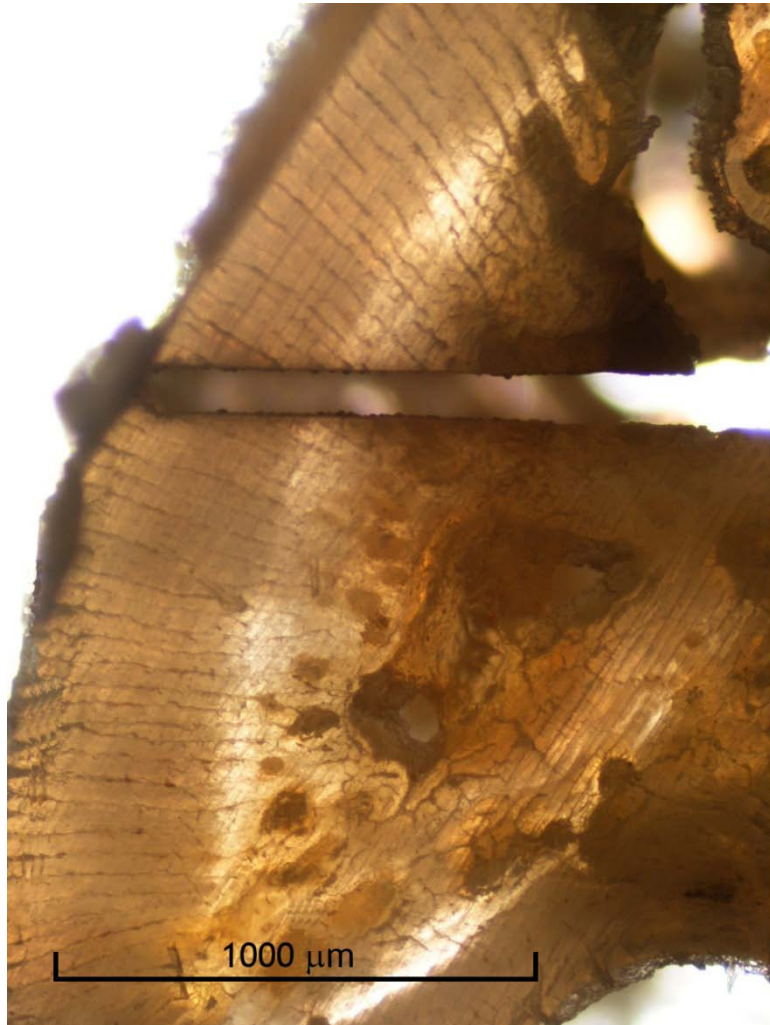
### Muestra E



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

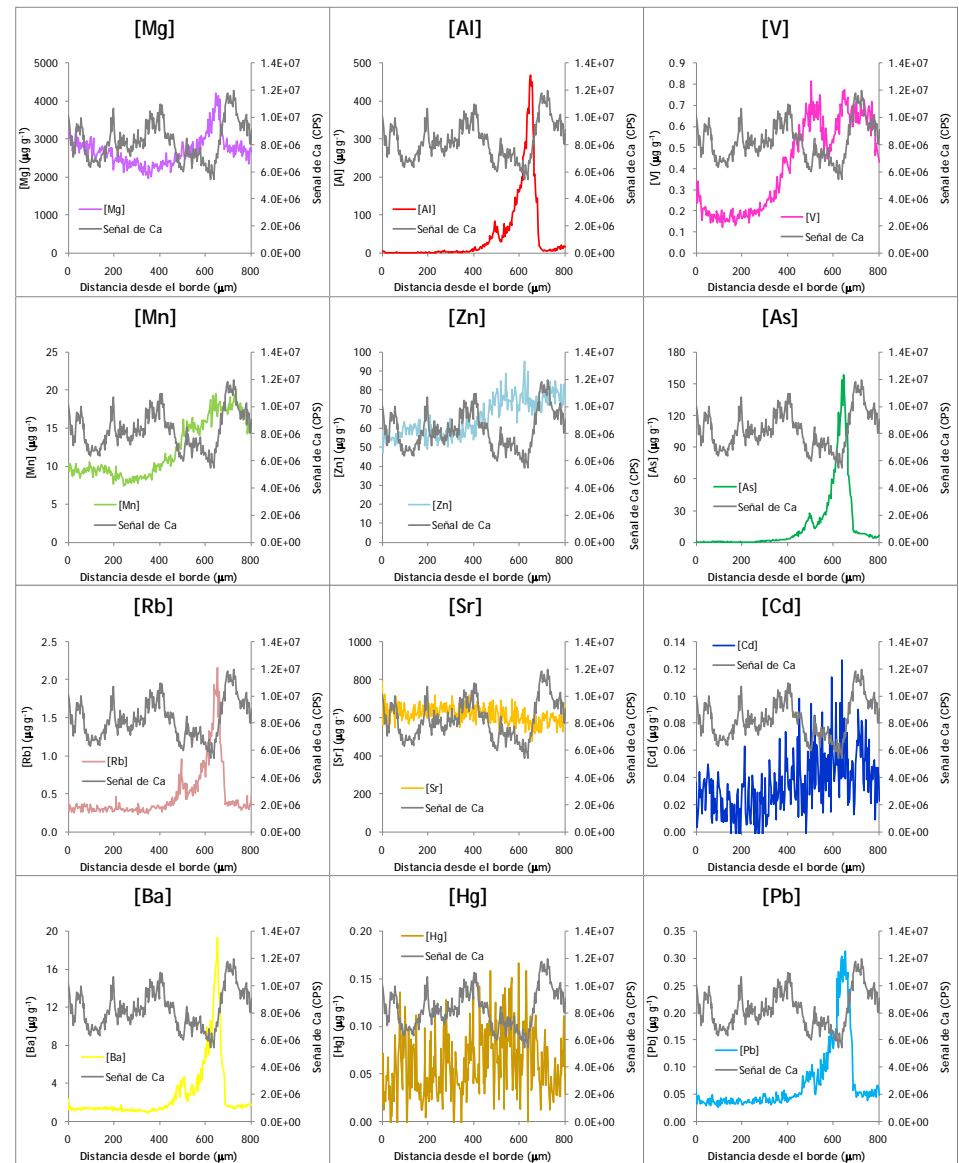
## Muestra F



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

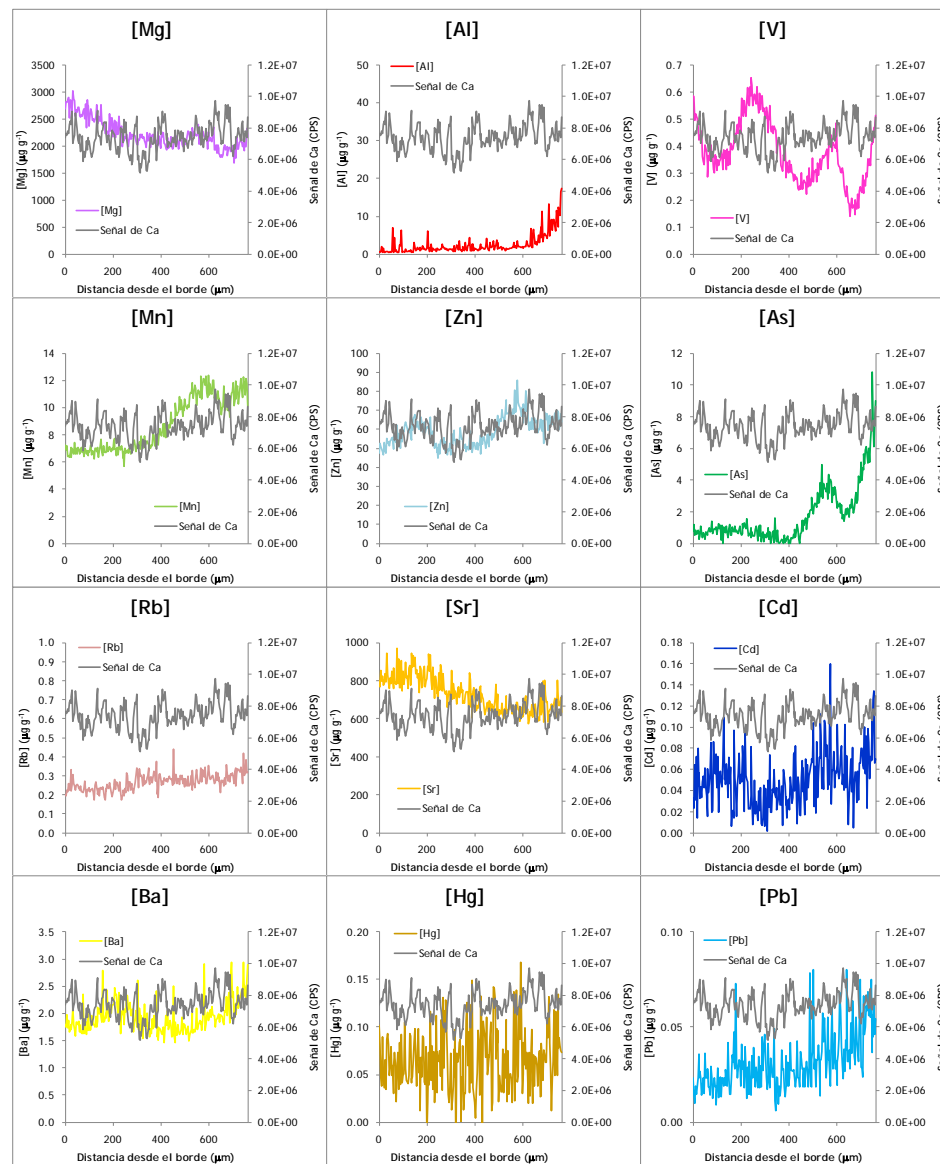
### Muestra G



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

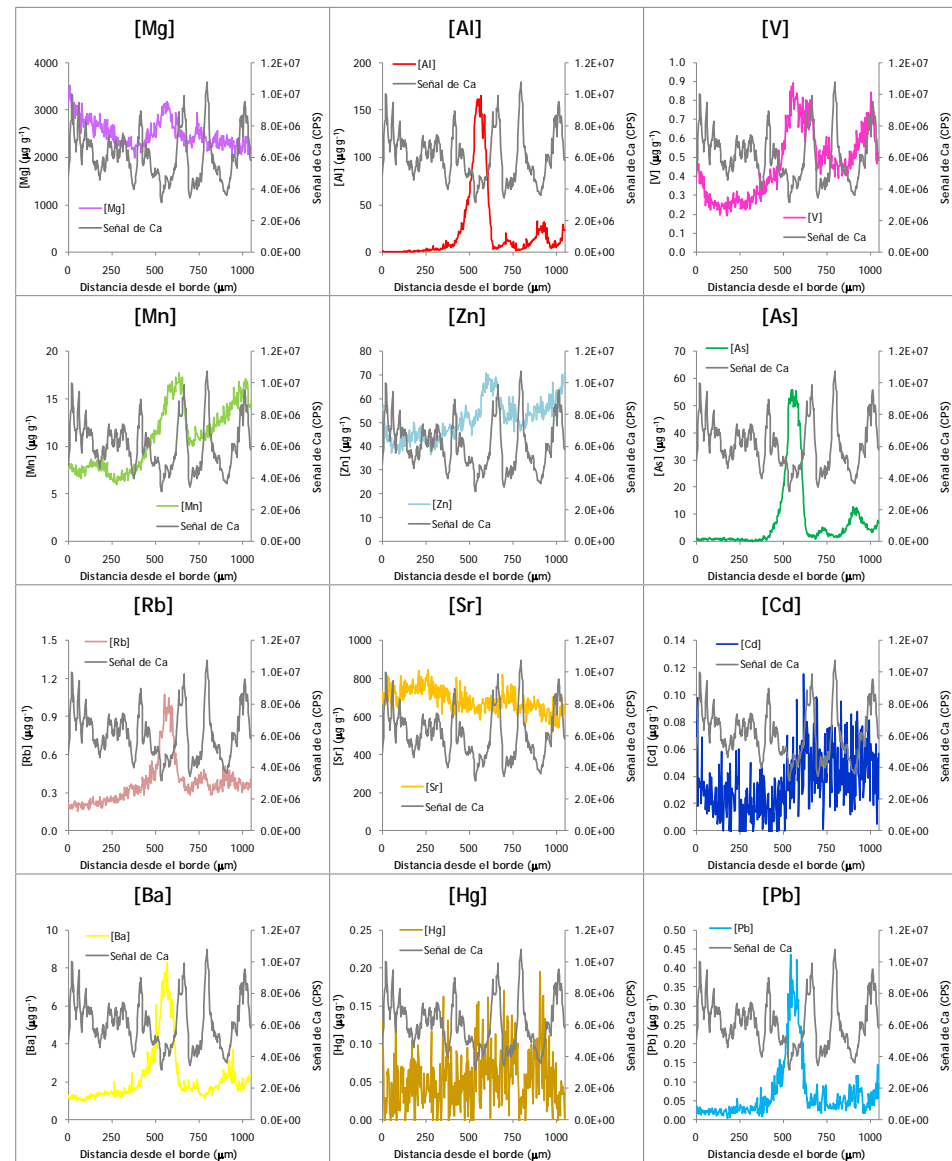
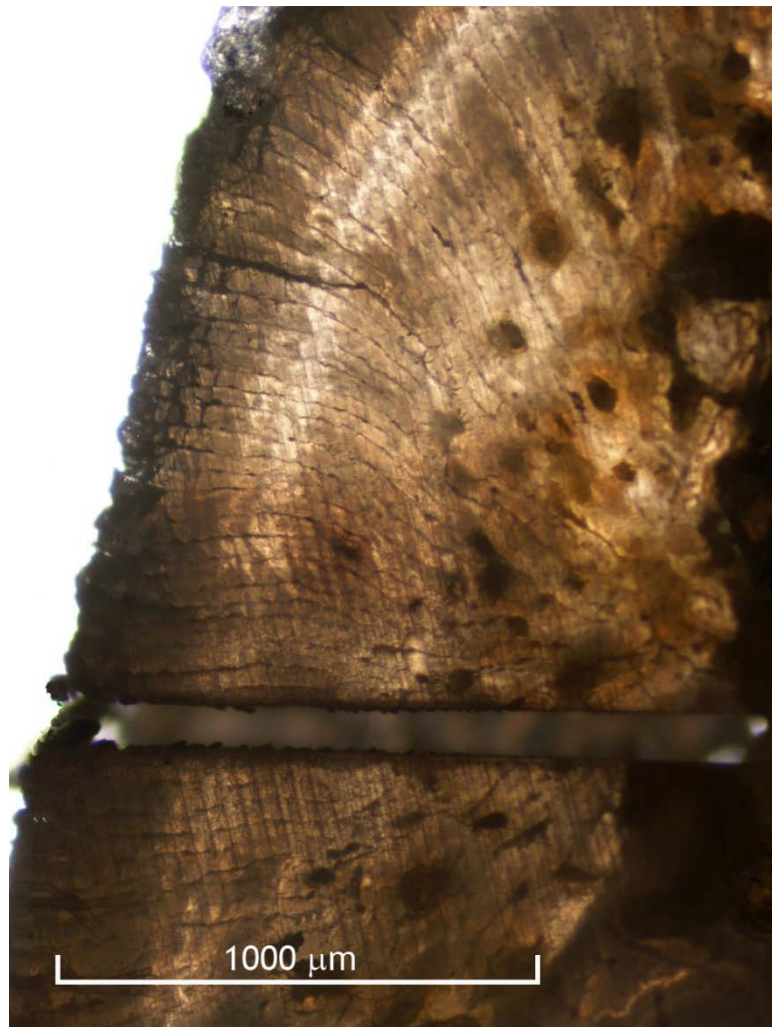
## Muestra H



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

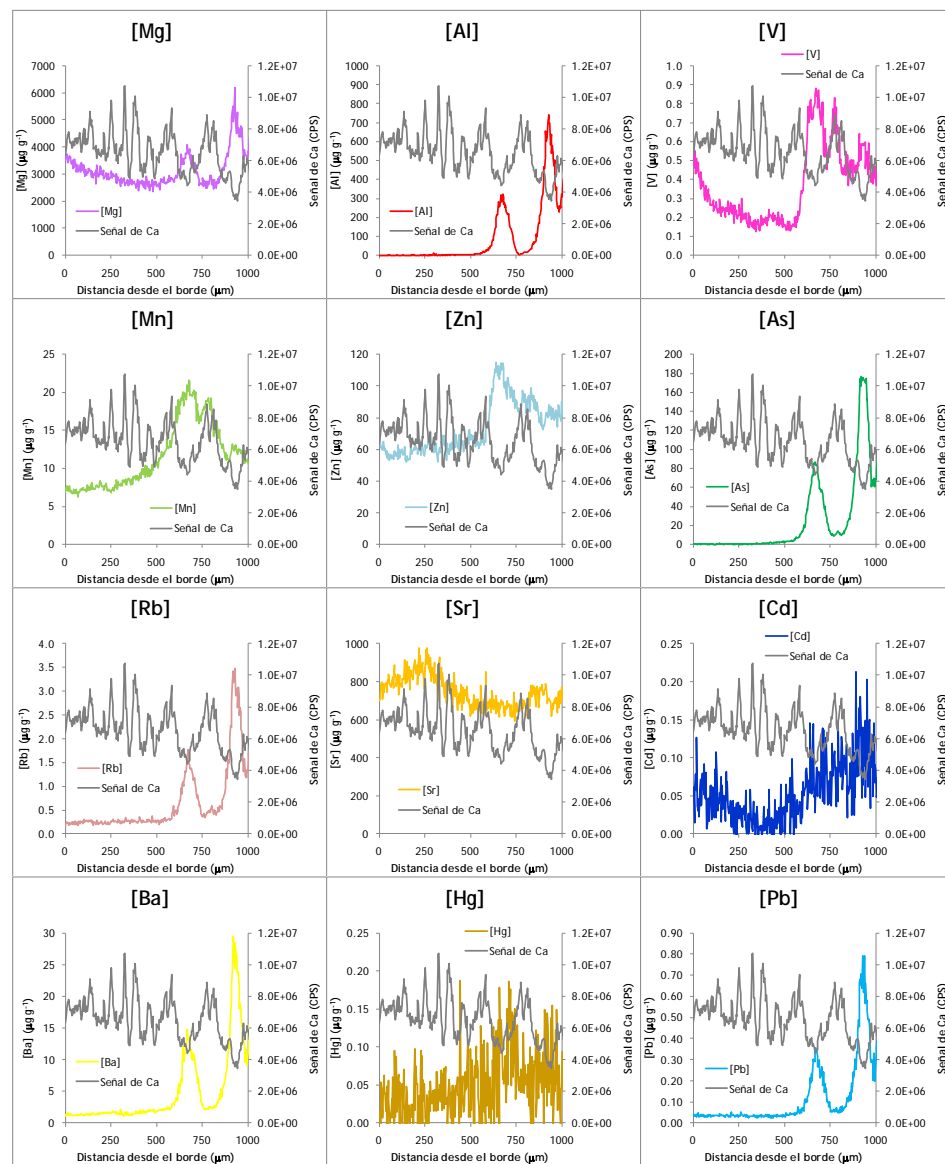
## Muestra I



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

## Muestra J

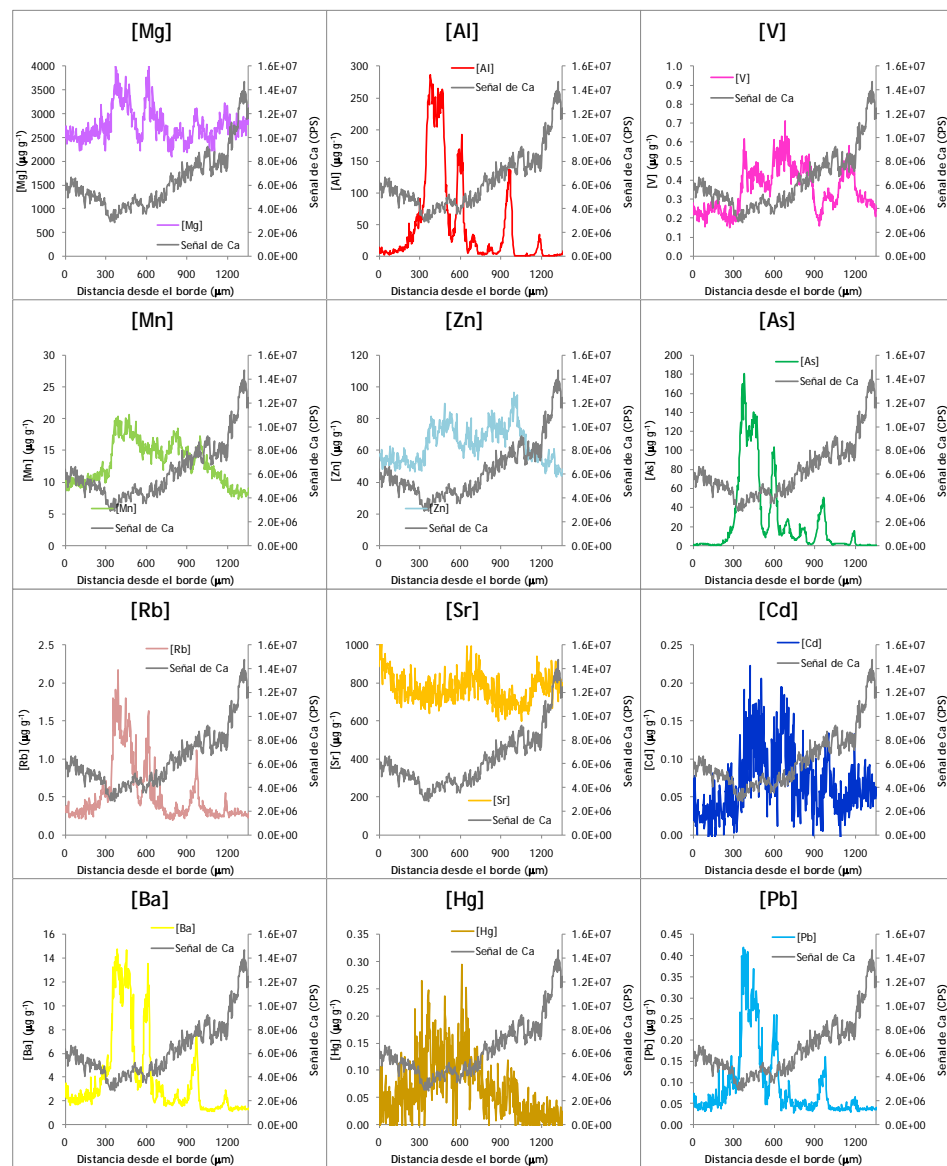




Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

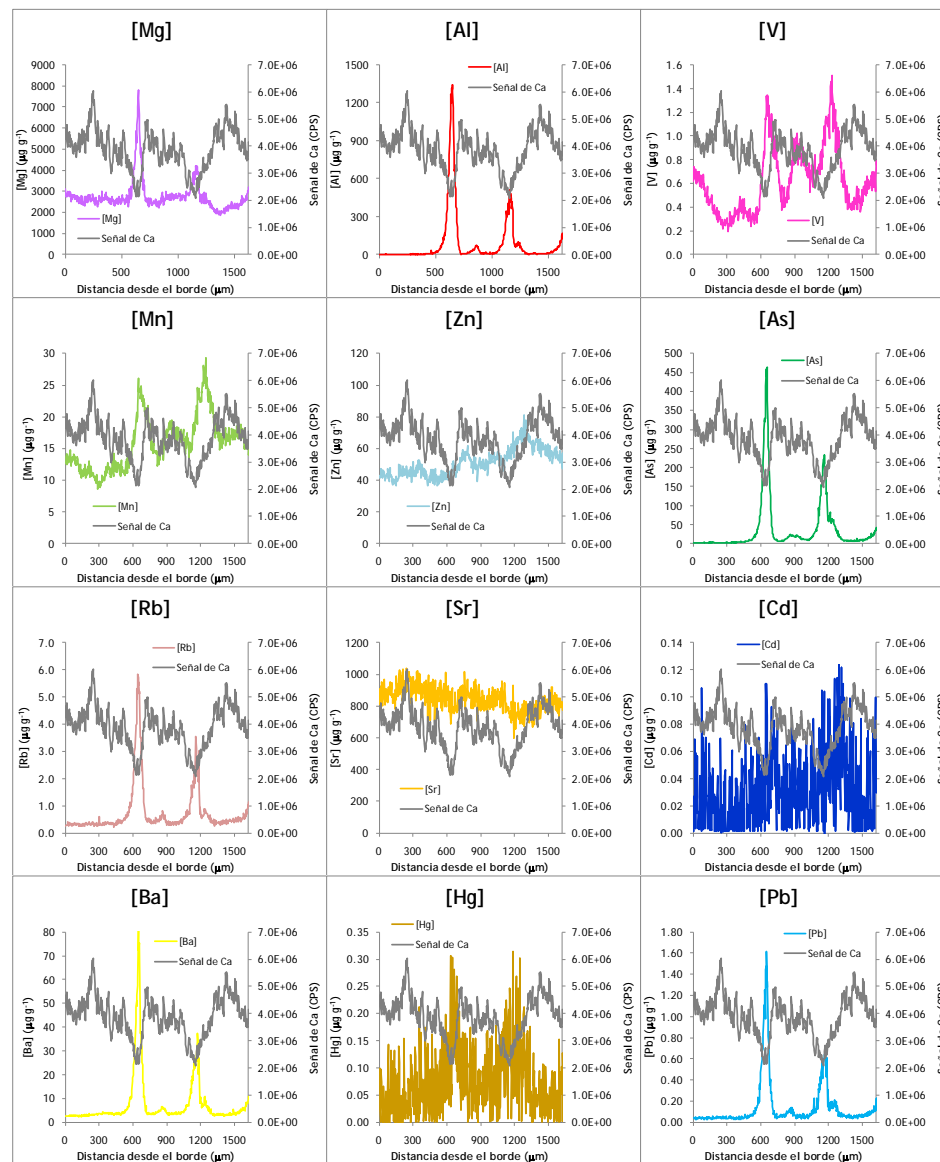
## Muestra K



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

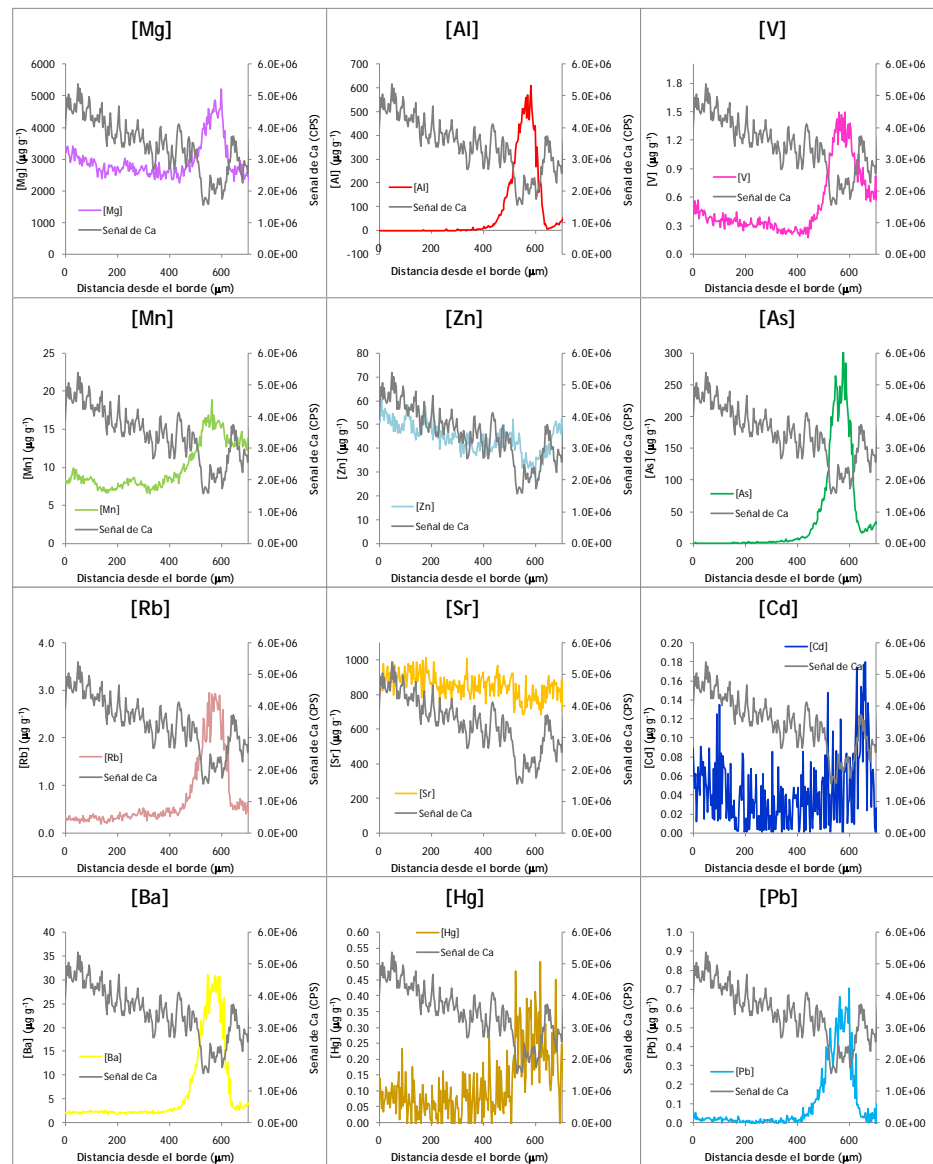
## Muestra L



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

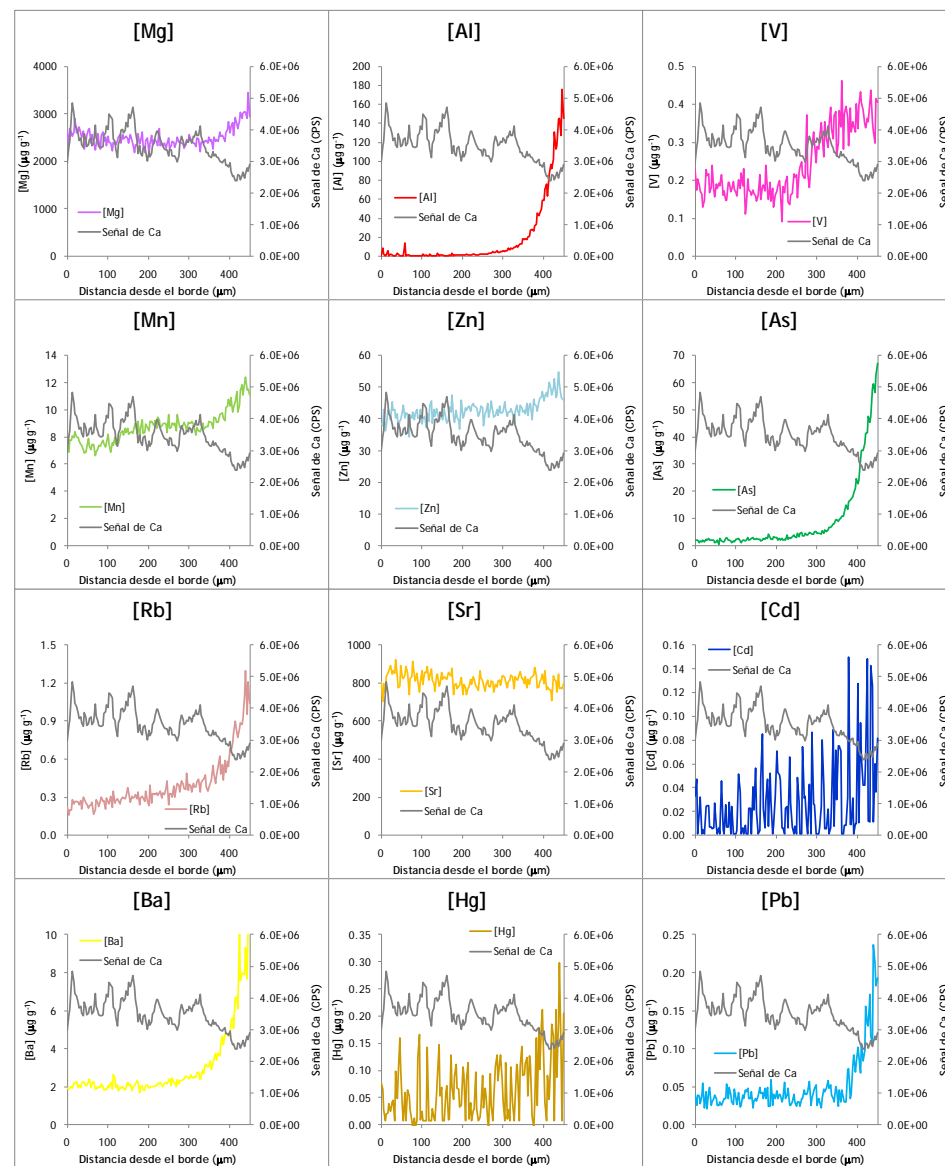
## Muestra M



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

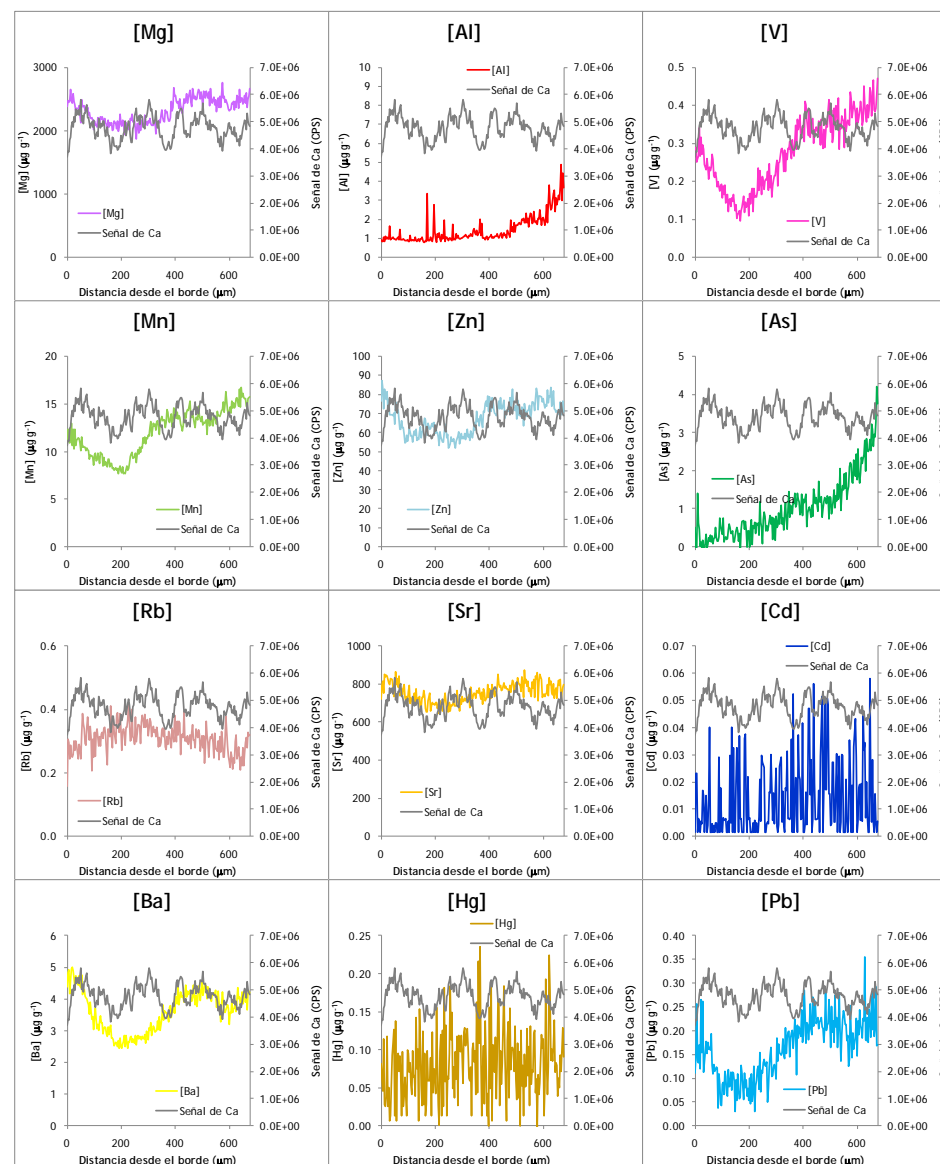
## Muestra N



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

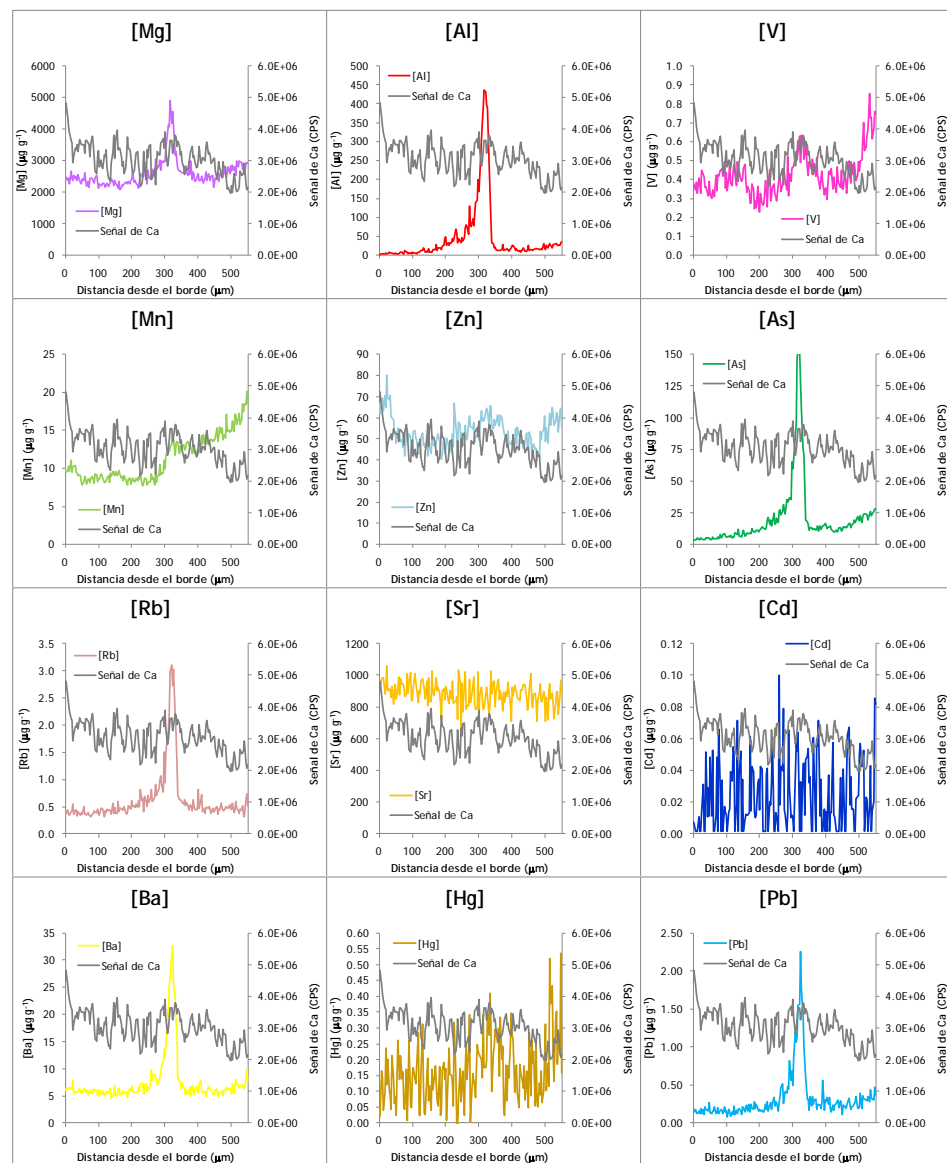
## Muestra Ñ



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

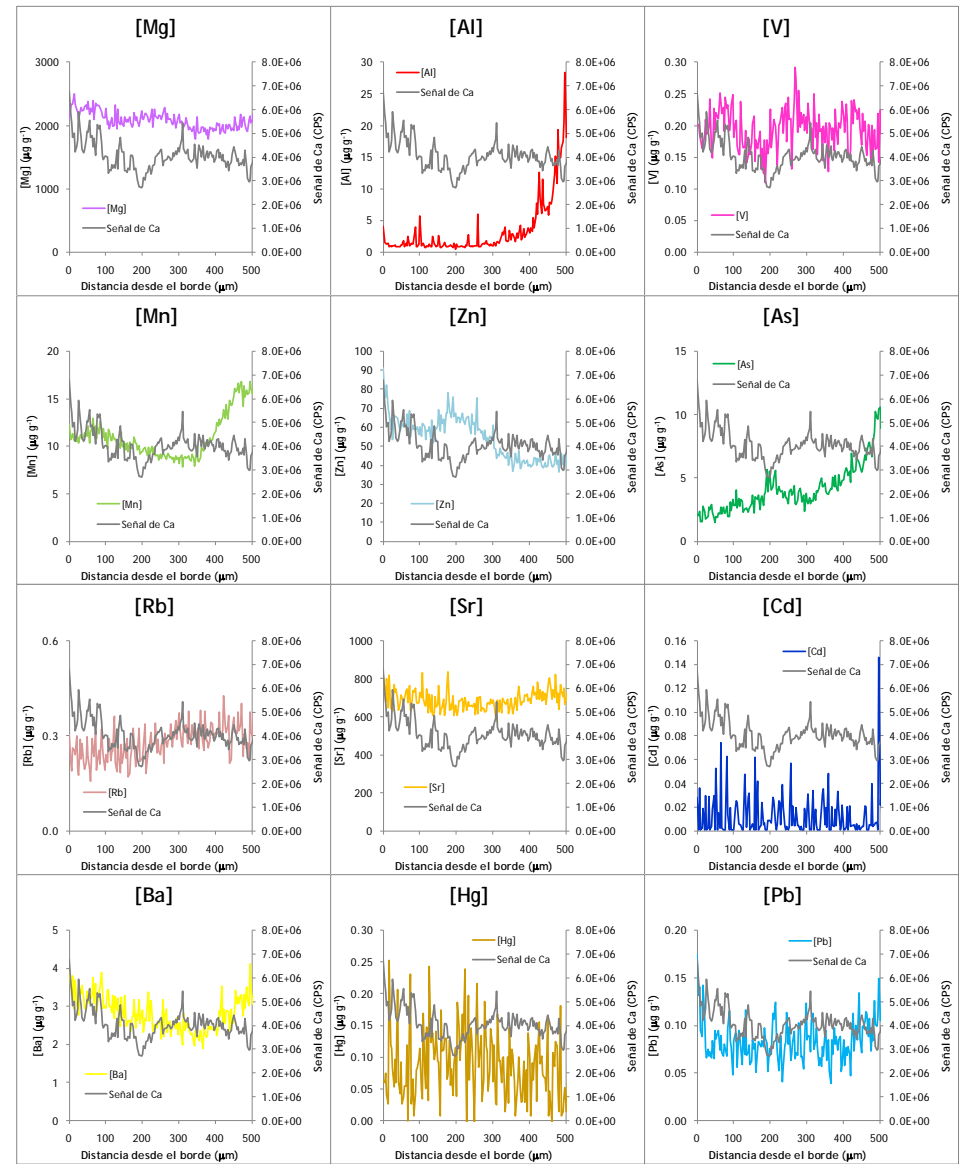
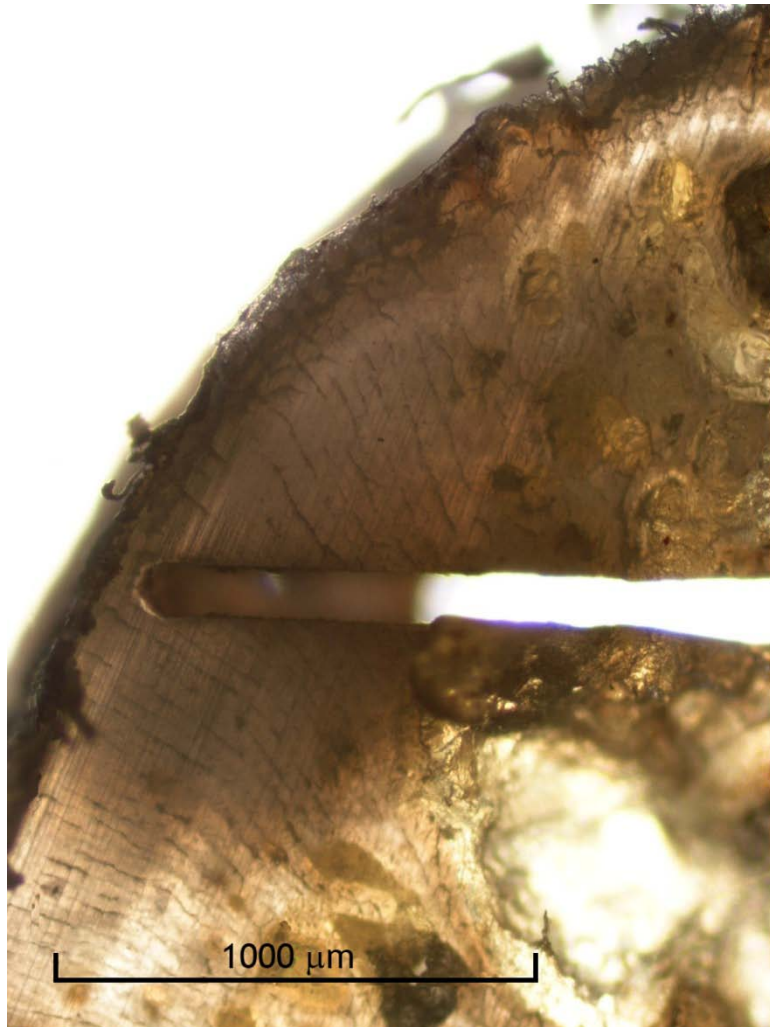
## Muestra O



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

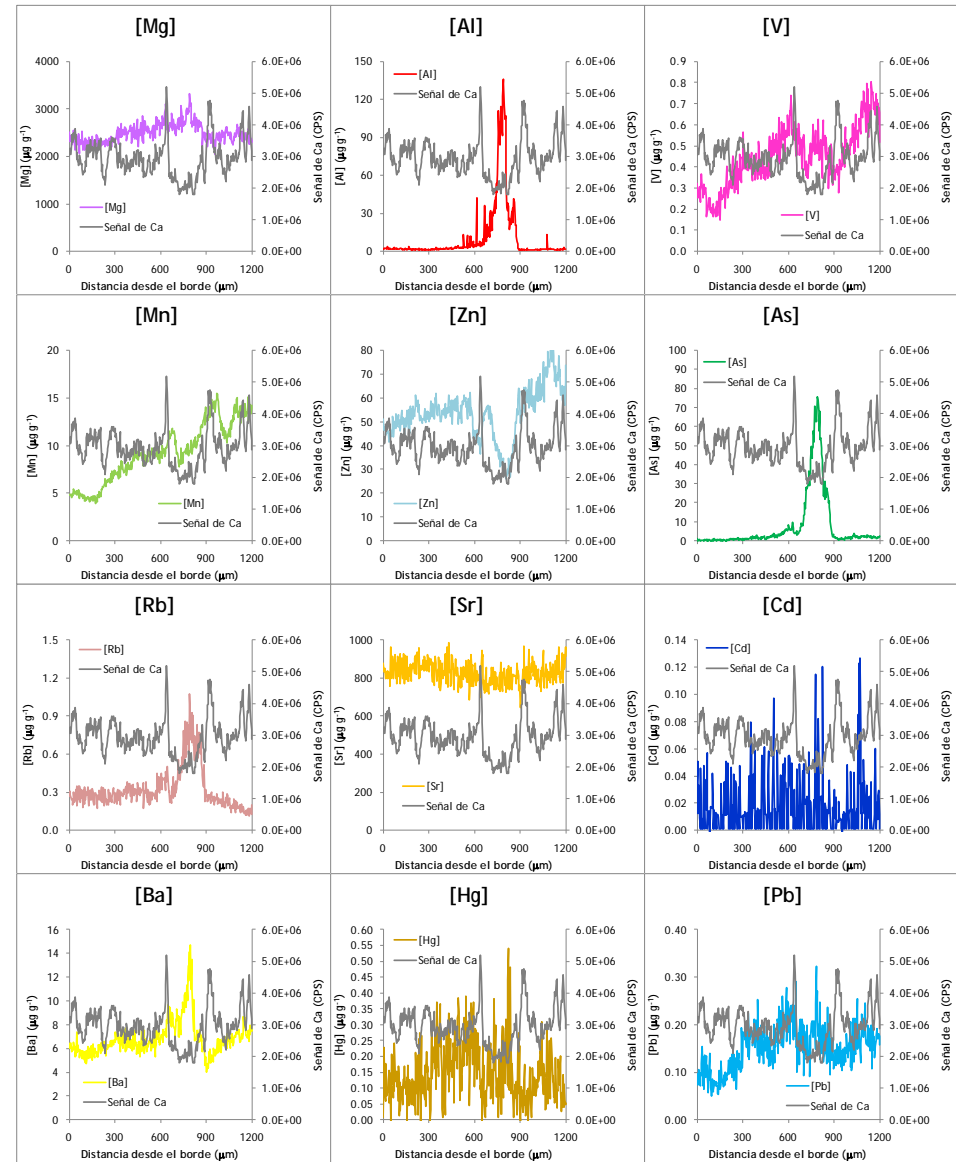
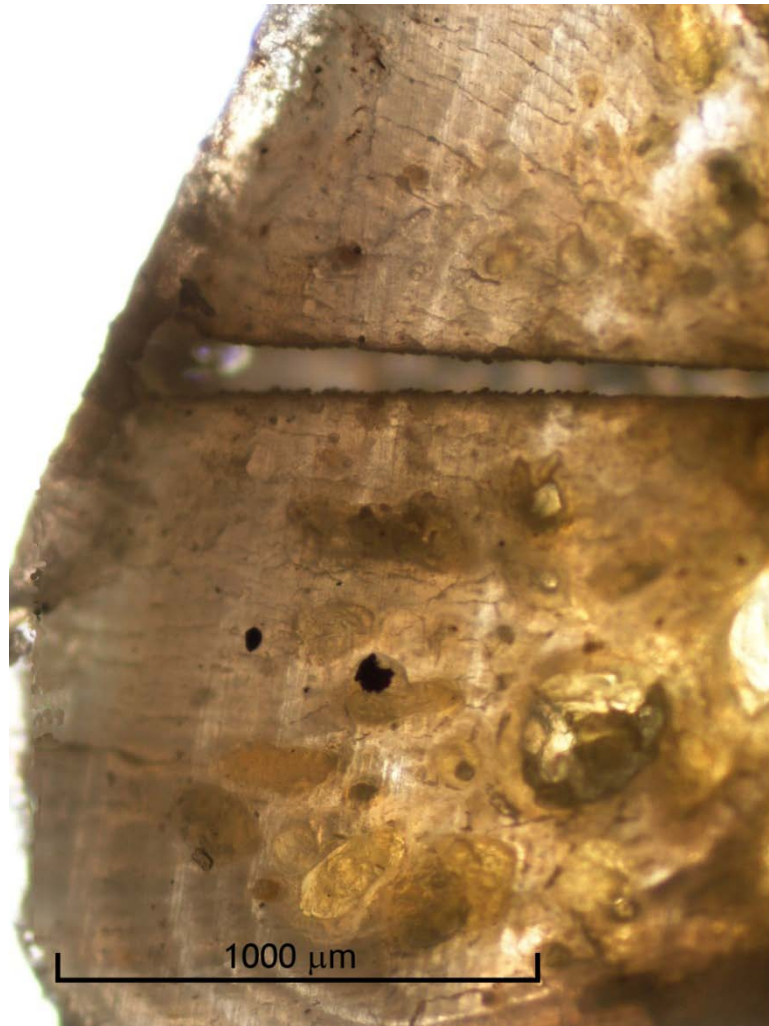
### Muestra P



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

## Muestra Q

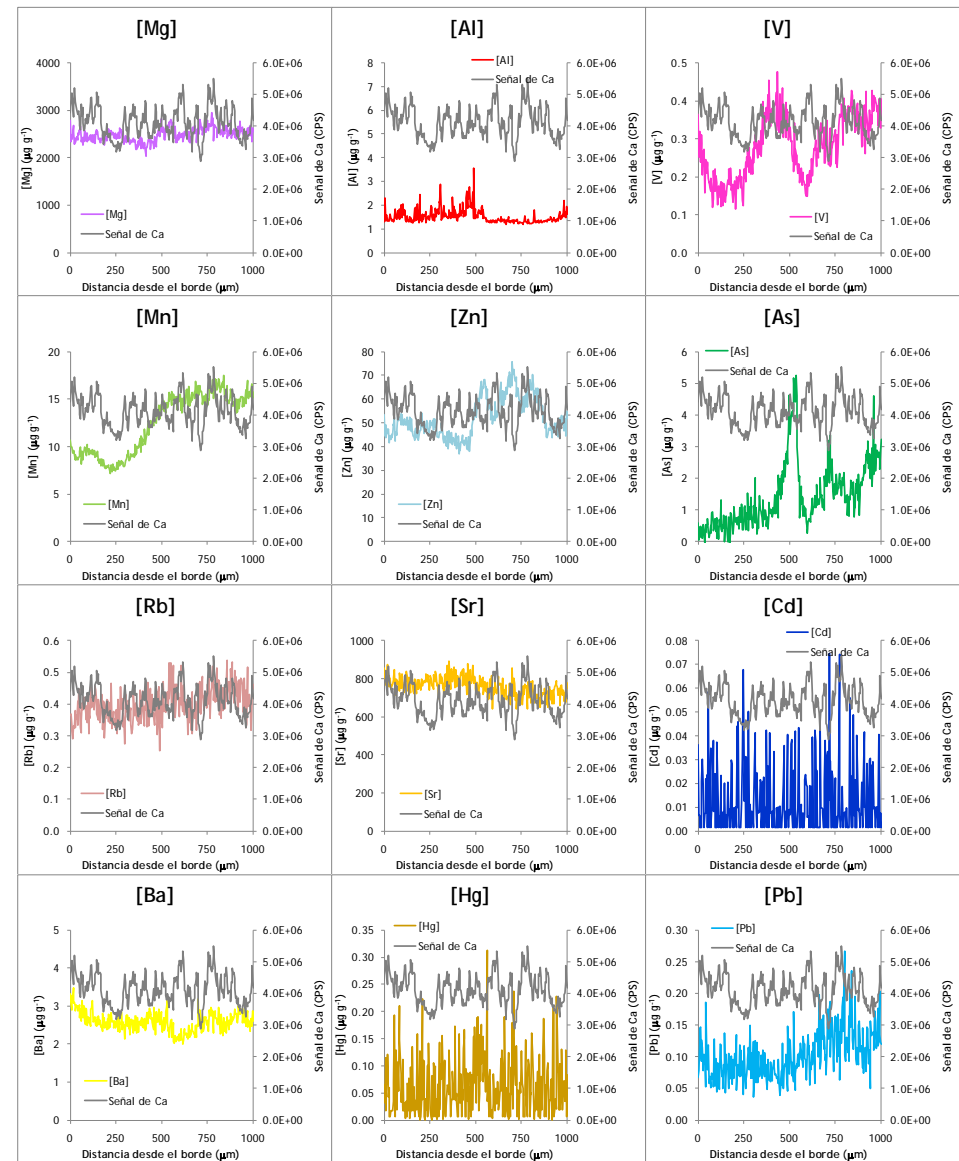
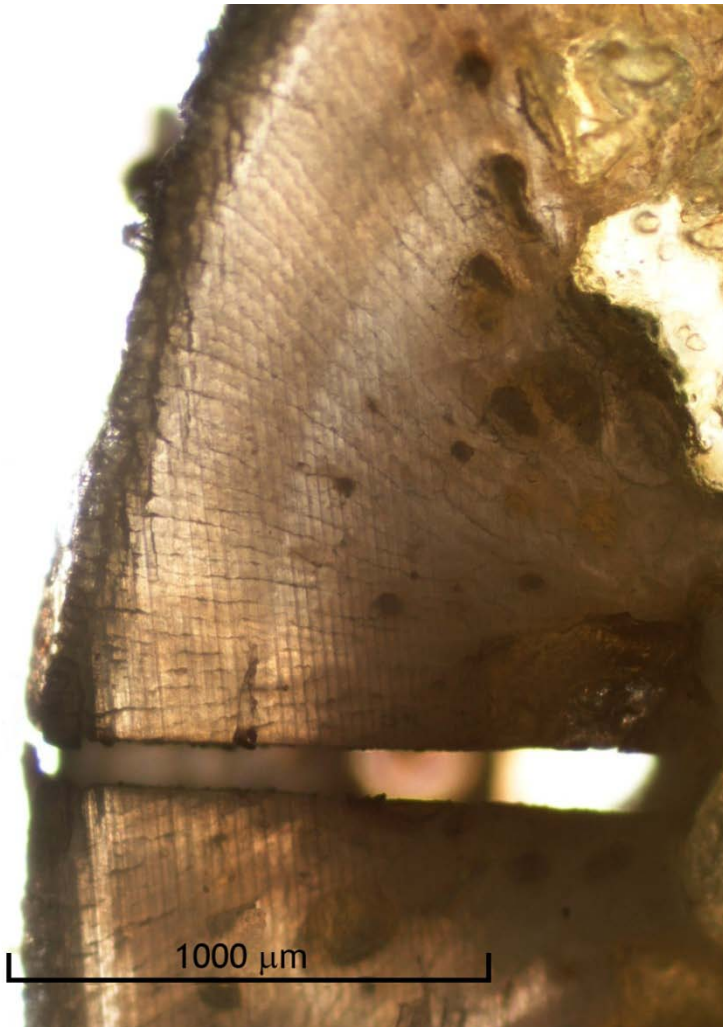




Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

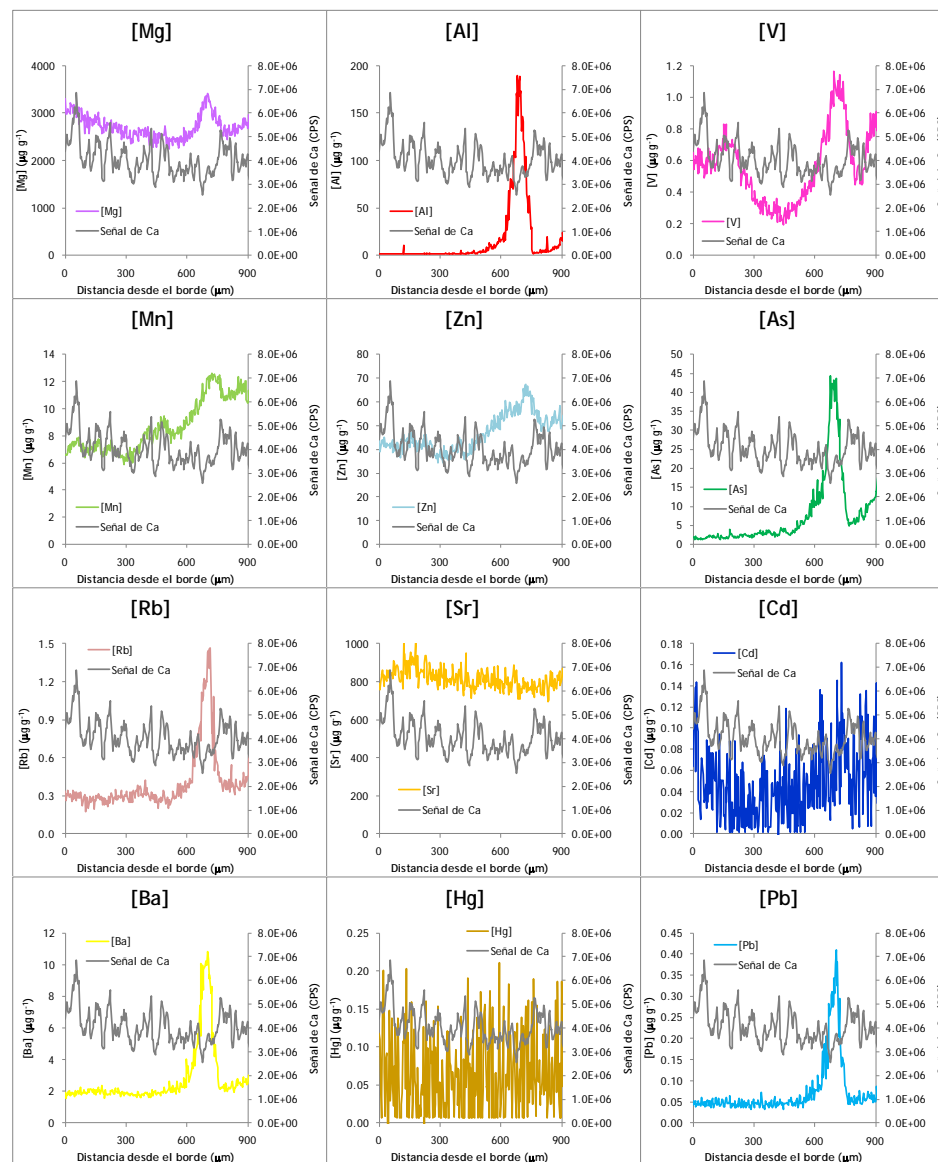
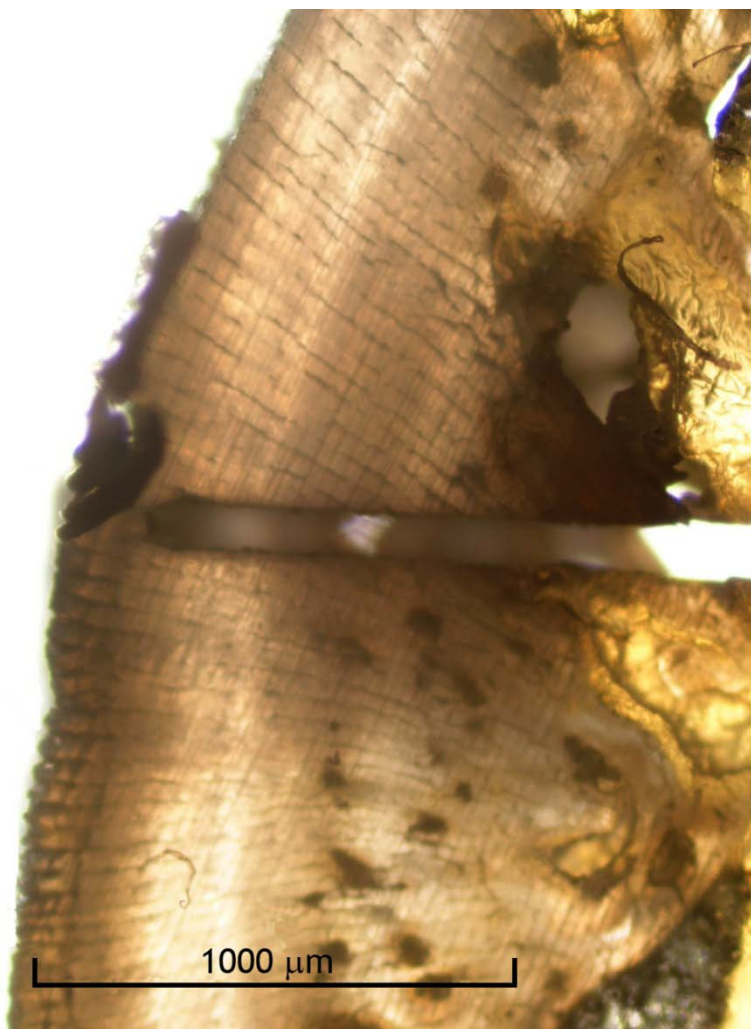
## Muestra R



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras bonito (*Thunnus alalunga*)

## Muestra S



# Anexo: Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras de atún rojo (*Thunnus thynnus*) analizadas

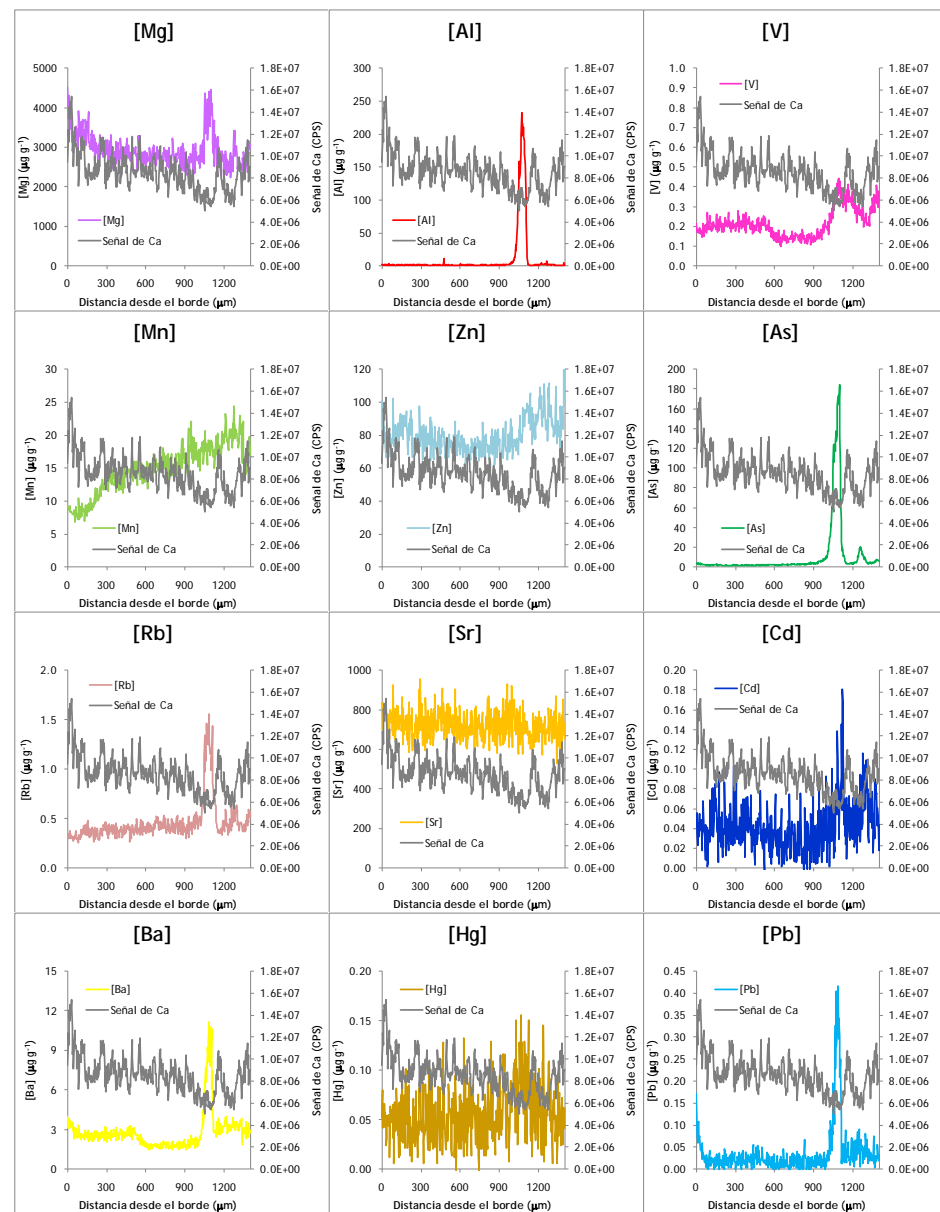
Development of new applications of inductively  
coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)  
hyphenated with different sample introduction  
systems

Ana Ugarte Baztan  
2011

Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras atún rojo (*Thunnus thynnus*)

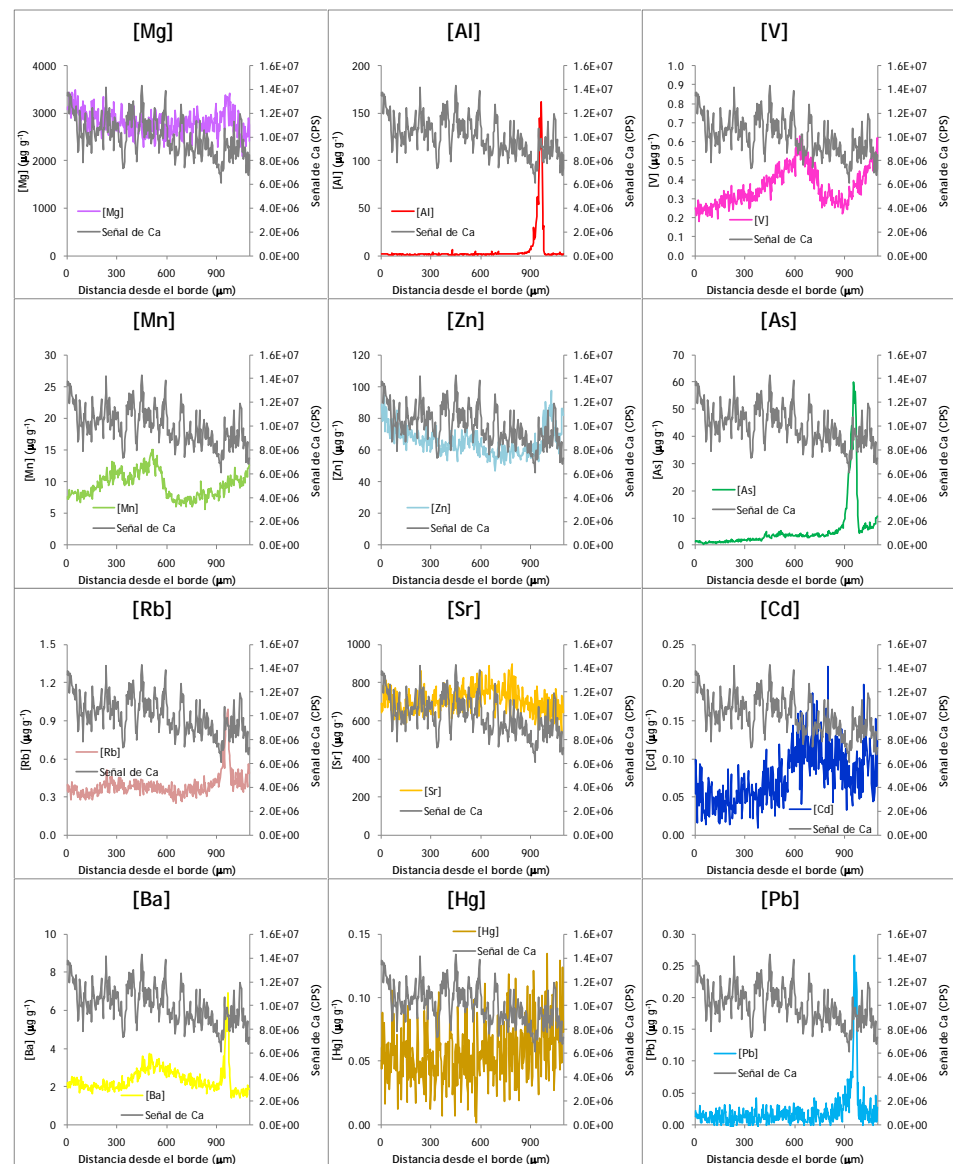
Muestra A



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras atún rojo (*Thunnus thynnus*)

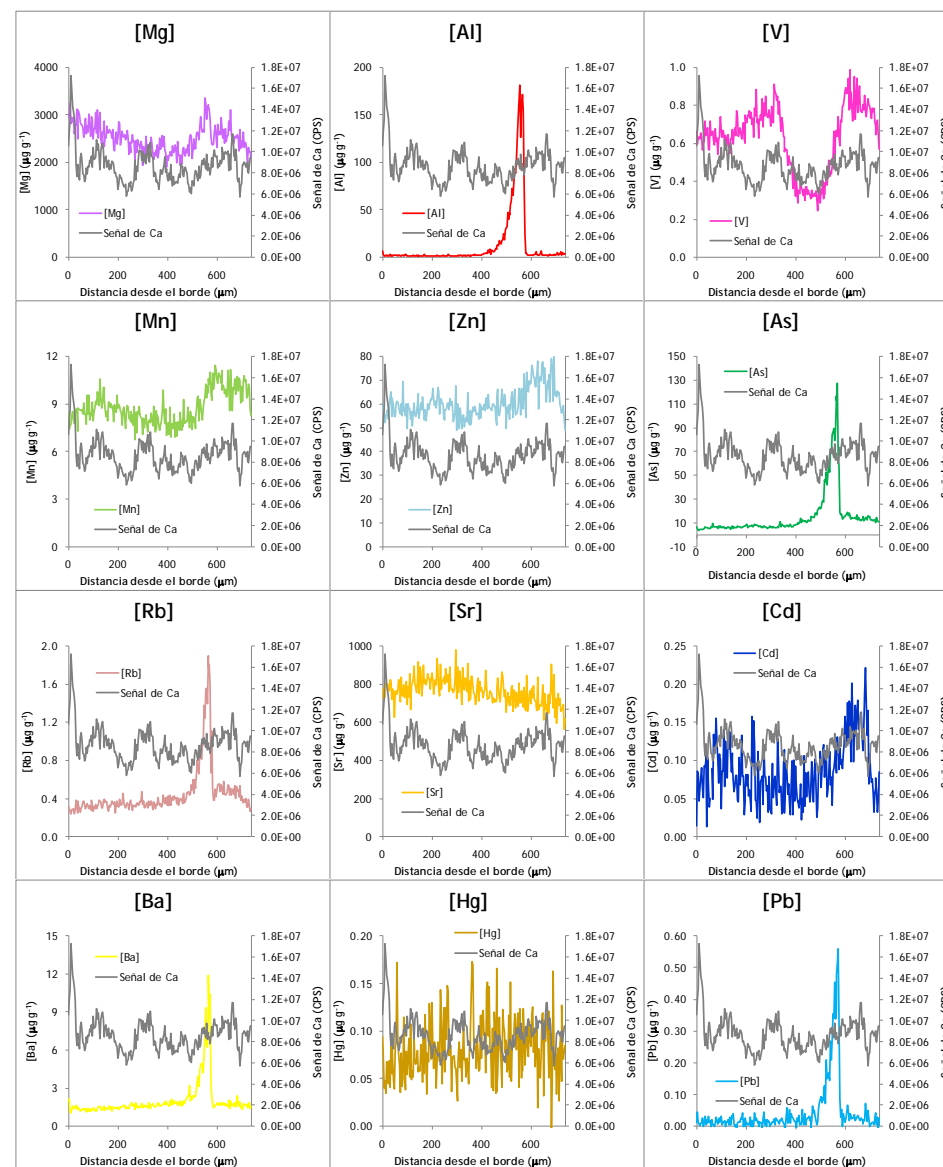
## Muestra B



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras atún rojo (*Thunnus thynnus*)

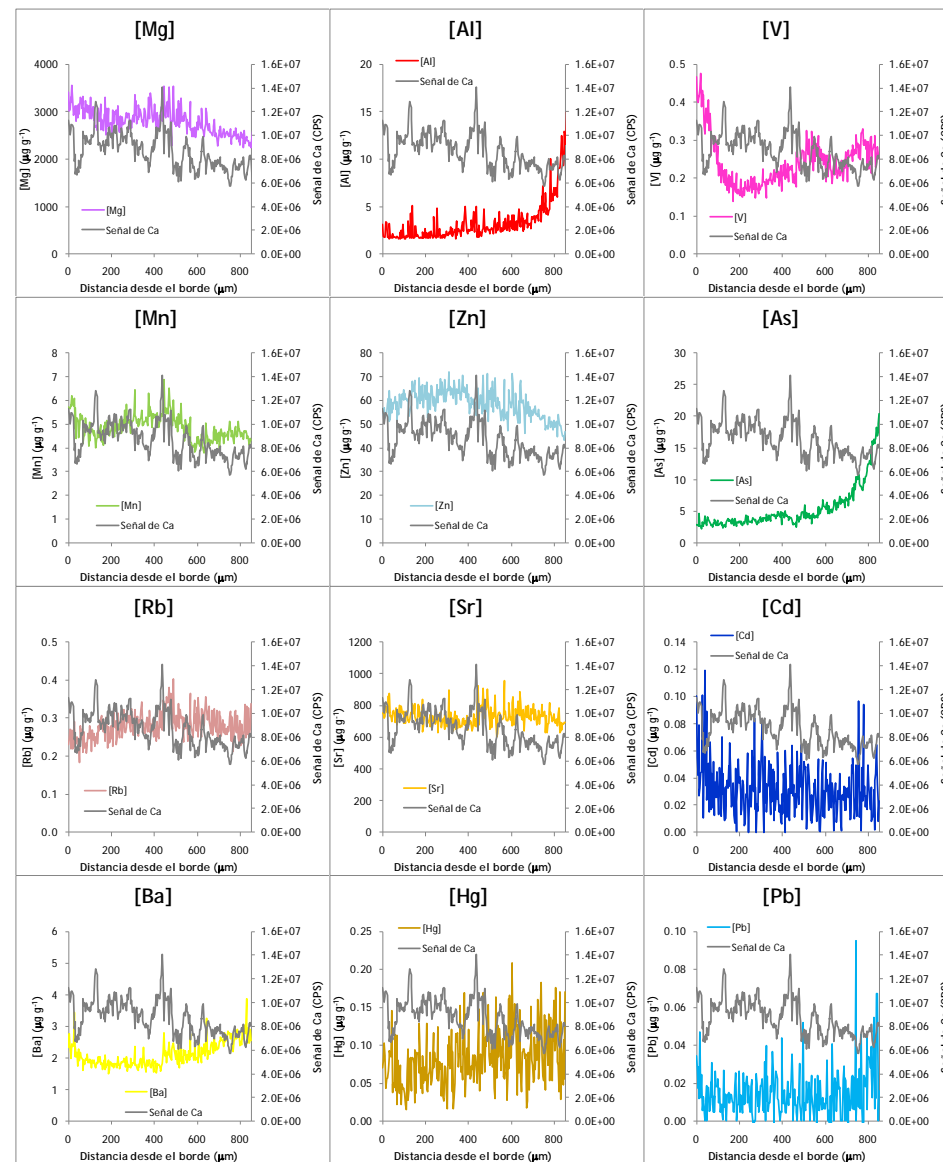
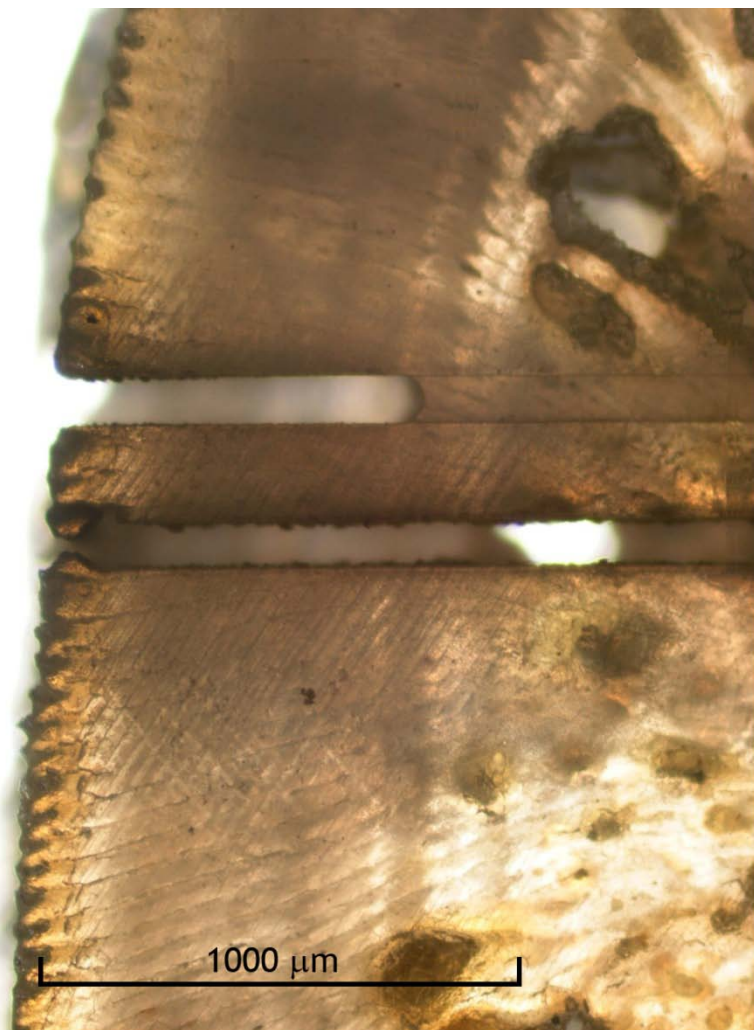
## Muestra C



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras atún rojo (*Thunnus thynnus*)

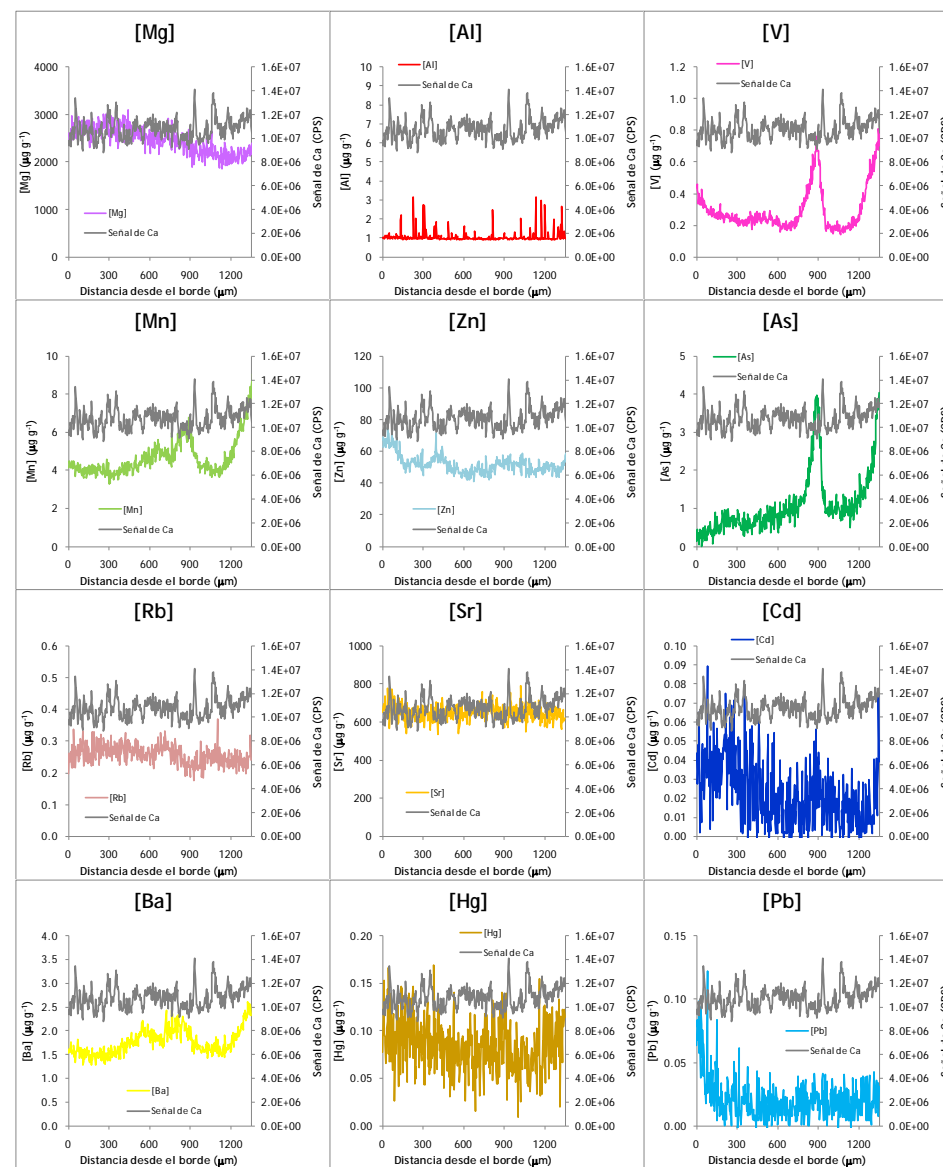
### Muestra D



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras atún rojo (*Thunnus thynnus*)

## Muestra E

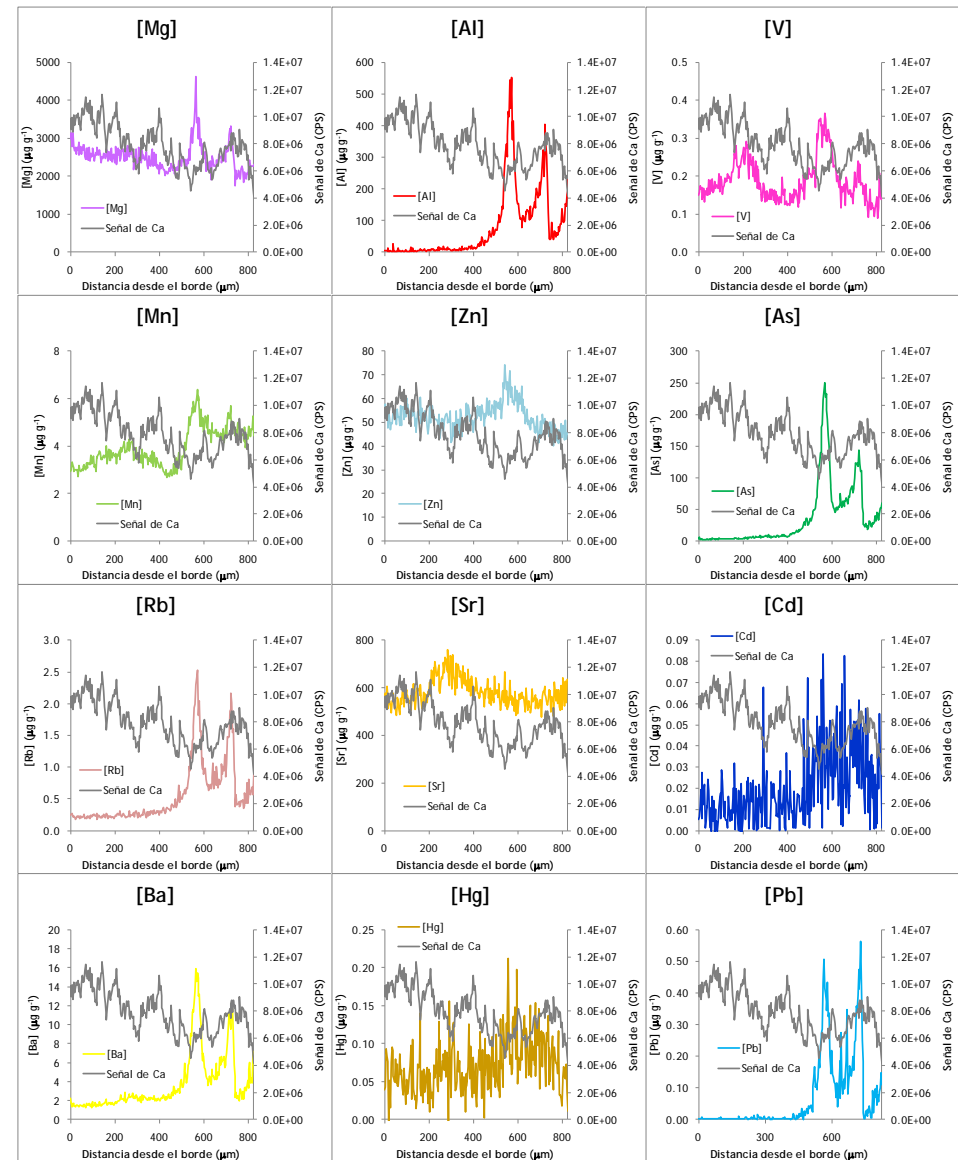




Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras atún rojo (*Thunnus thynnus*)

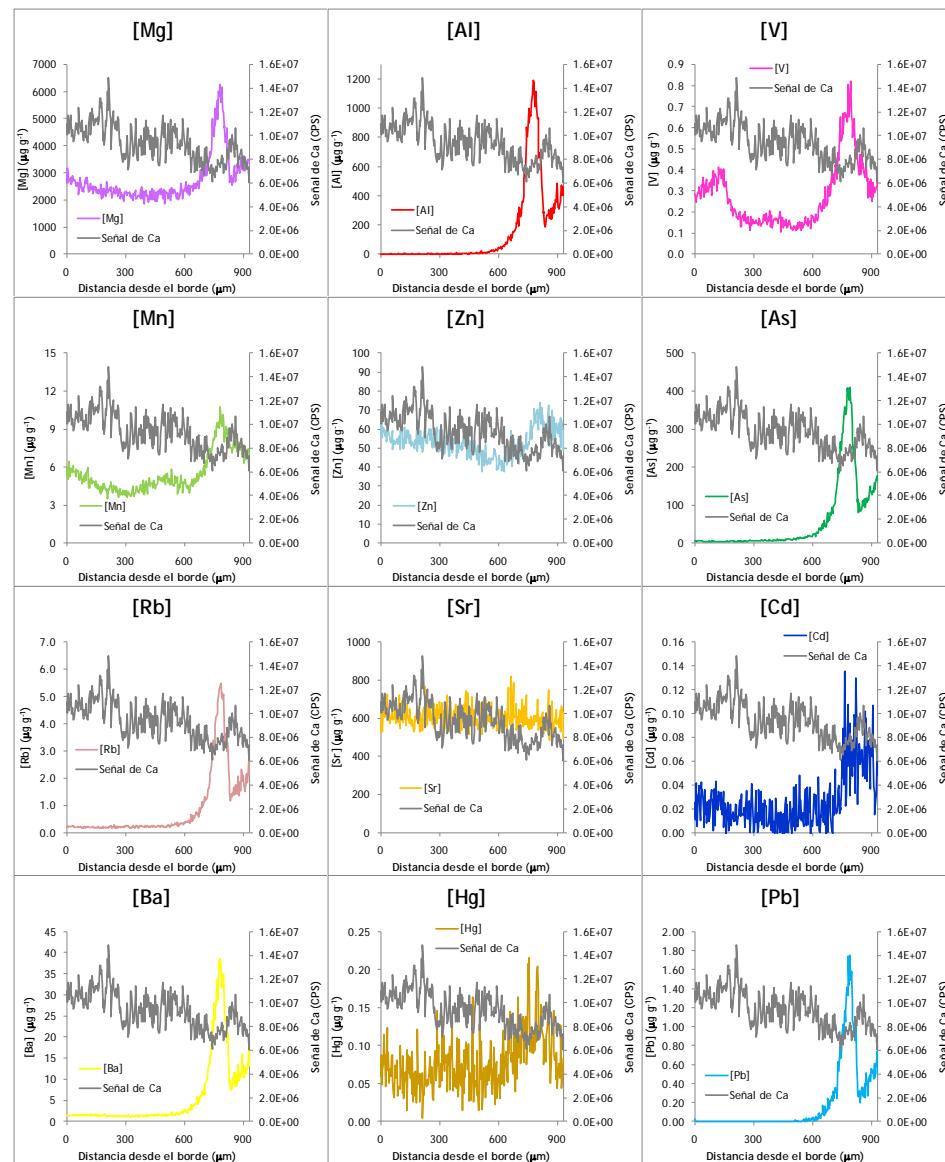
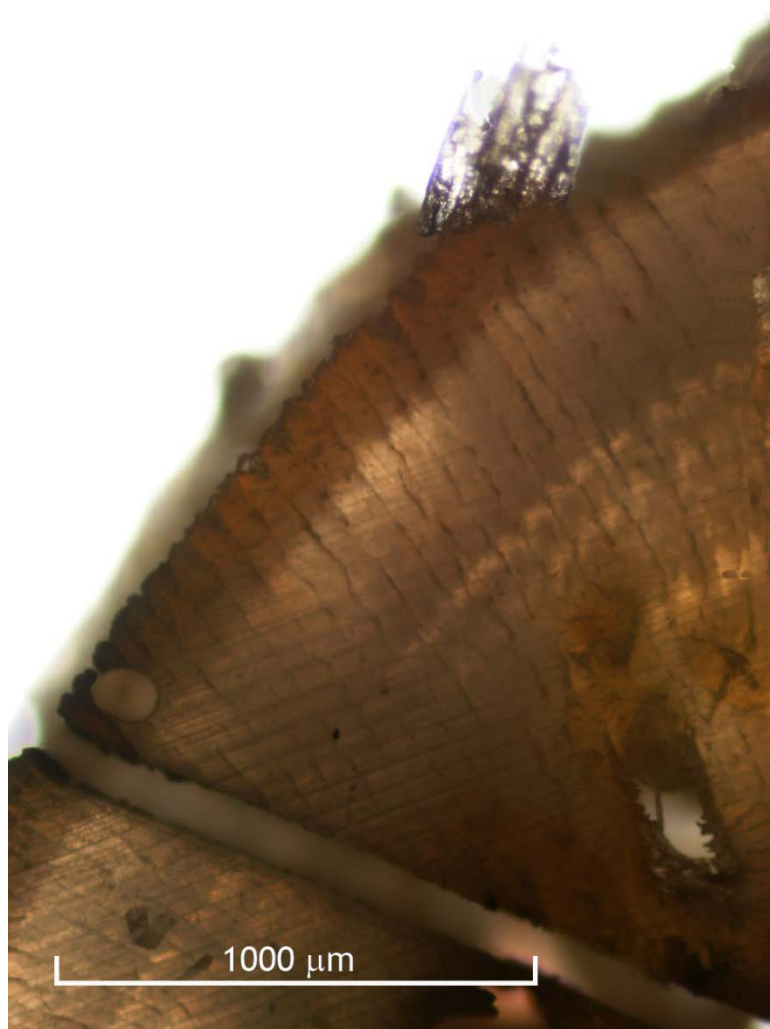
### Muestra F



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras atún rojo (*Thunnus thynnus*)

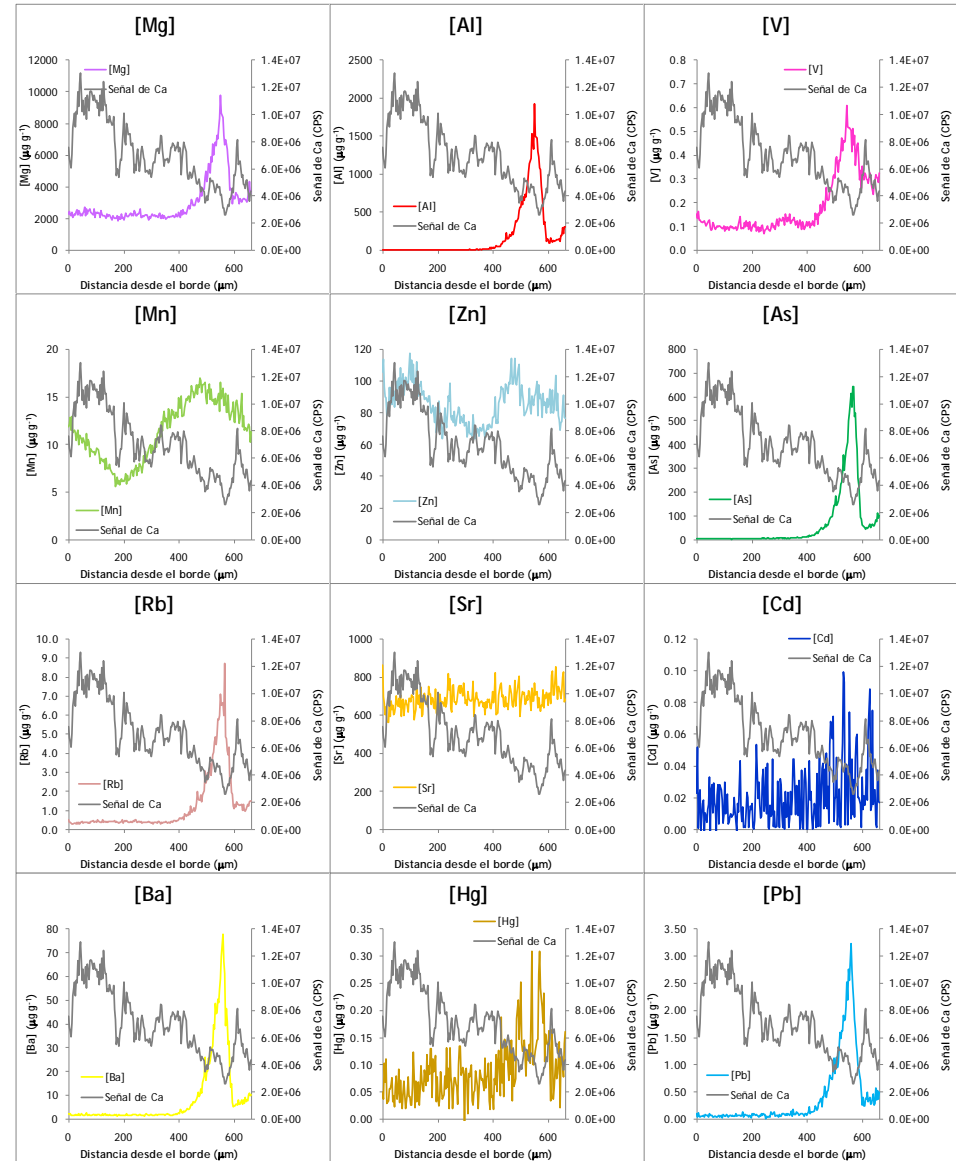
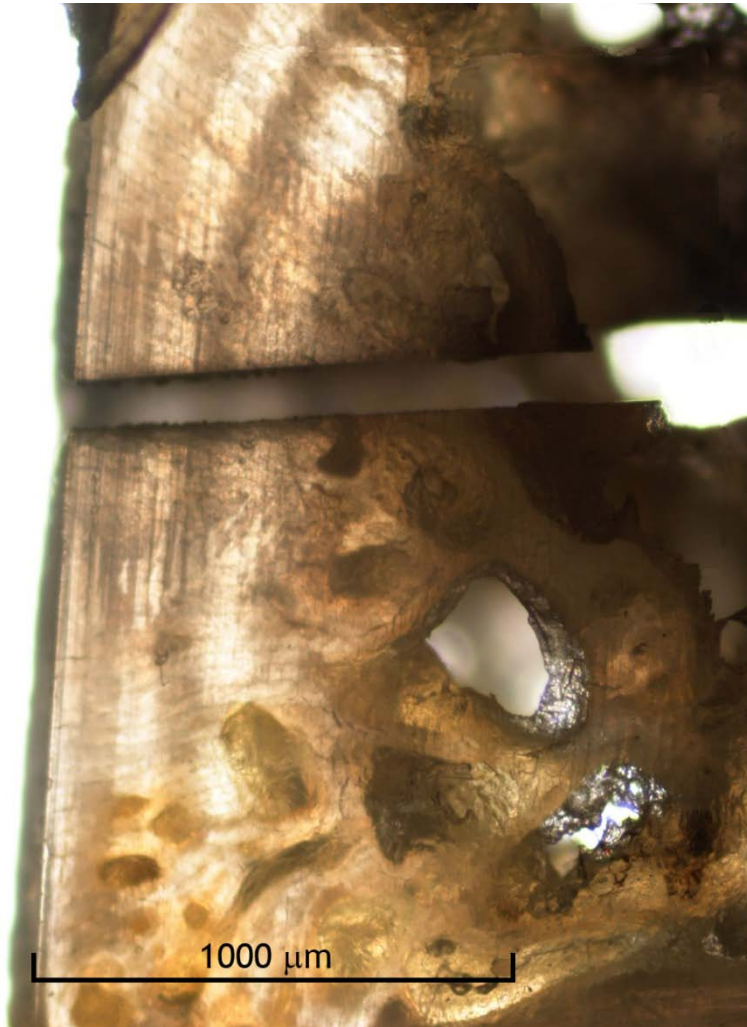
## Muestra G



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras atún rojo (*Thunnus thynnus*)

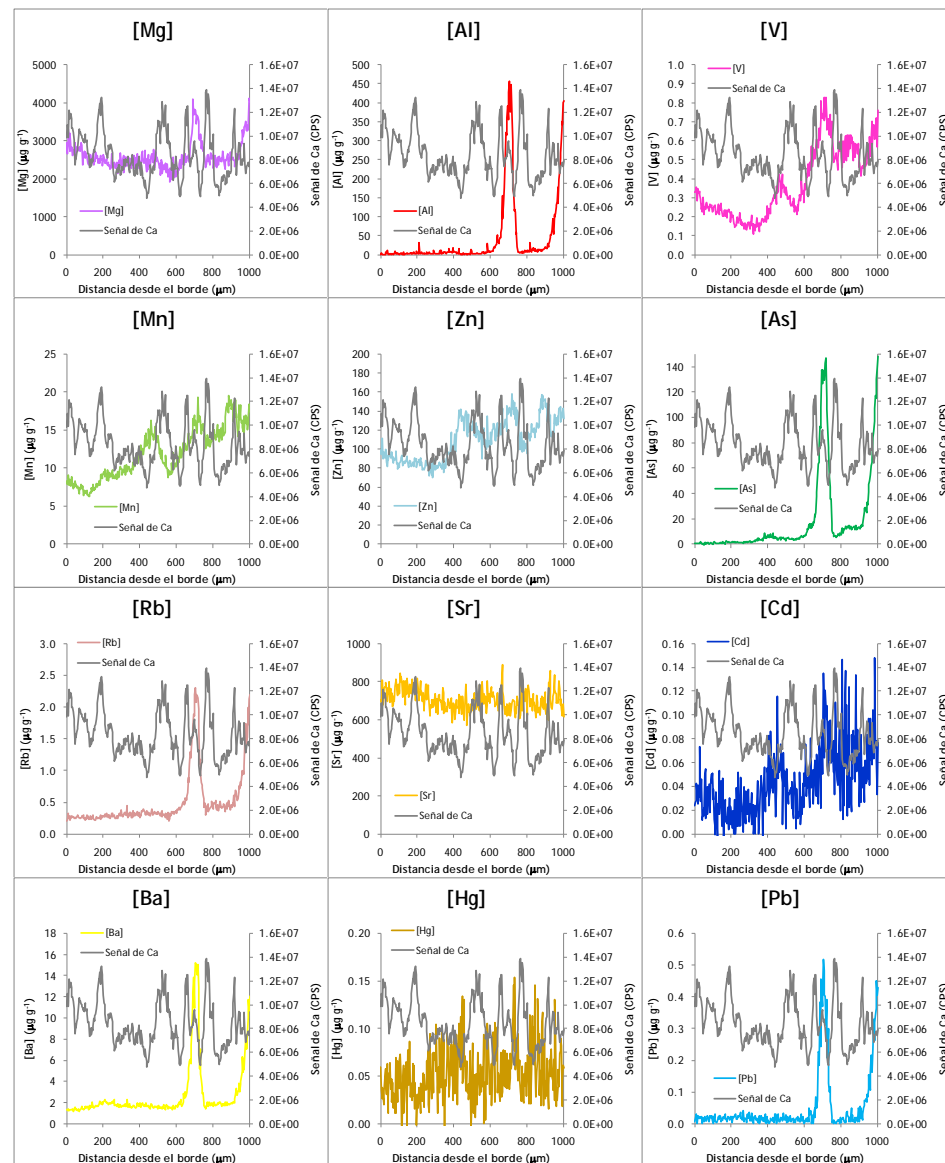
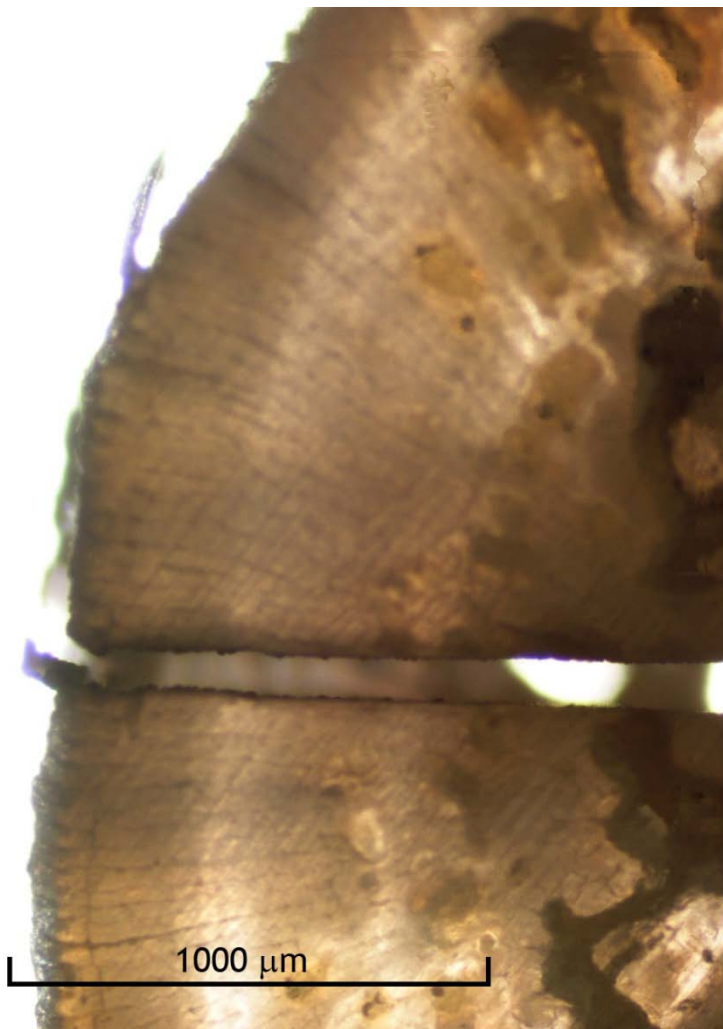
## Muestra H



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras atún rojo (*Thunnus thynnus*)

## Muestra I



Anexo:

Perfiles de concentración obtenidos por LA-ICP-MS para las muestras analizadas: Muestras atún rojo (*Thunnus thynnus*)

### Muestra J

