

DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA EL ANÁLISIS DE RETARDANTES DE LLAMA Y COMPUESTOS PERFLUORADOS EN EL AIRE AMBIENTE MEDIANTE EL USO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN CON ANALIZADOR ORBITRAP

Parte 1: Estudio de las condiciones cromatográficas, optimización de la fragmentación y diseño de la base de datos

Máster en técnicas cromatográficas aplicadas - curso 2013/2014

Laboratorio de Salud Pública de Valencia – FISABIO

Tutora: Maria Ibañez Martinez

Supervisor: Vicent Yusà Pelechà

Autora: Vanessa Belles Blasco

27-Junio-2014

Índice

Resumen.....	3
Palabras clave.....	3
Introducción	4
- Retardantes de fuego y compuestos fluorados	4
- Análisis en el aire ambiente	6
- LC-HRMS	11
Objetivos	15
Metodología	16
- Reactivos y equipo	16
- Procedimiento experimental	20
Resultados y discusión.....	21
1. Estudio de las condiciones cromatográficas	21
1.1. Columnas cromatográficas.....	21
1.2. Fases móviles	23
2. Optimización de la energía de colisión (fragmentación) de la celda HCD	26
3. Base de datos inicial para el análisis post-target.....	32
Conclusiones	34
Bibliografía	35
Anexo I.....	39

Resumen

Los retardantes de llama son cada vez más utilizados, pero con el paso del tiempo la mayor parte de ellos se desprenden y pasan al aire ambiente. Existen métodos para la detección de algunos de ellos, pero no hay ningún método que englobe un número elevado. Por este motivo se ha querido desarrollar este método, aprovechando además las ventajas que ofrece la HRMS frente a los métodos convencionales.

En este trabajo se ha llevado a cabo la optimización tanto de la columna como de las condiciones cromatográficas, además de llevar a cabo la elección de la mejor energía de la celda HCD para la obtención de los fragmentos de cada compuesto.

Palabras clave

Retardantes de llama
Compuestos perfluorados
LC
HRMS
Orbitrap

Introducción

Retardantes de fuego y compuestos fluorados

Los retardantes de llama (FRs) son sustancias de distinta composición que se añaden como aditivos a textiles, plásticos, materiales de construcción, equipos electrónicos, etc. que permiten retardar la aparición de la llama o bien ralentizar el crecimiento del fuego cuando entra en ignición. No obstante, esto no significa que este material se vuelva ignífugo o no combustible [1].

En la actualidad hay más de 175 retardantes de llama diferentes, y habitualmente se clasifican en cuatro grandes grupos: inorgánicos, compuestos y mezclas basados en el nitrógeno, organofosforados y orgánicos halogenados (bromados) [2]. Los más relevantes por su volumen de producción e impacto en la salud y el medio ambiente son los compuestos halogenados y organofosforados [3].

Los retardantes de llama fosforados (PFRs) también se utilizan como plastificantes, estabilizadores, antiespumantes y agentes humectantes, como aditivos en lubricantes y fluidos hidráulicos, etc. [4]. El hecho de que no estén enlazados químicamente al material al que acompañan, junto a los grandes volúmenes consumidos y su amplio rango de aplicaciones, ha despertado sospechas de que podrían alcanzar distintos ecosistemas y dispersarse mediante volatilización [5]. Como resultado de esto y de su creciente consumo pueden ser detectados en las aguas terrestres, subterráneas, océanos y en el aire, tanto exterior como interior [6]. Algunos de estos compuestos, especialmente los fosforados halogenados, tienen una elevada persistencia en el medio ambiente y una ligera biodegradabilidad [7].

Los compuestos fluorados (PFCs) poseen una parte hidrófoba y otra lipófoba dentro de la misma molécula, por lo que son útiles en un amplio rango de aplicaciones, tanto en la industria como en la producción comercial. Se utilizan como surfactantes, lubricantes, pinturas, pulimientos y en envases de alimentos, además de su uso como retardantes de llama [8].

En la última década los PFCs se han identificado como contaminantes emergentes en los alimentos, especialmente en pescados, y el medio ambiente, debido a su presencia en varios tipos de matrices, tanto bióticas como abióticas, incluyendo tejidos y fluidos humanos [9].

Los retardantes de llama bromados (BFRs) han sido los últimos en desarrollarse como FRs, pero a pesar de eso en 2003 ya se producían comercialmente más de 75 compuestos para esta finalidad [10]. En sus inicios, los estudios se basaban en tres grupos: éteres difenílicos y bifenílicos polibromados (PBDEs y PBBs), hexabromociclododecanos (HBCDs) y tetrabromobisfenol-A (TBBPA) [5].

Cuando tiene lugar un incendio, los materiales sólidos se descomponen por el calor en gases inflamables. Hay varios mecanismos por los que actúan los FR, pero los más efectivos son las reacciones en fase gas y en fase sólida [11].

Los retardantes de llama halogenados (bromados) actúan en fase gas eliminando los radicales H^+ y OH^- de los gases inflamables mediante su reacción con los átomos de Cl y Br. La eliminación de los radicales H^+ y OH^- provoca una desaceleración en la

combustión y por tanto reduce la propagación del fuego [12]. Su eficacia depende del número de átomos de halógeno presentes en la molécula [13].

En cuanto a los retardantes de llama fosforados, es imposible describir un único mecanismo [14] debido a la amplia variedad de estructuras que poseen. Los PFRs no halogenados actúan principalmente en la fase sólida de los materiales en combustión. Cuando el fósforo se calienta, reacciona y se genera una forma polimérica de ácido fosfórico. Este ácido origina una capa carbonizada, que protege el material del oxígeno, previniendo de este modo la formación de gases inflamables. Otro mecanismo de acción de los PFRs es la contribución parcial a la extinción de la llama en la fase gaseosa, comparable a lo que ocurre cuando contiene cloro o bromo [12]. Cuando en el sistema están presentes tanto halógenos como fósforo, éstos actúan de manera independiente, por lo que el resultado es la suma de ambos procesos [10].

El consumo de estos FRs ha aumentado exponencialmente en los últimos años. La Asociación Europea de Retardantes de Llama (EFRA) [13] afirma que el consumo total de FRs en Europa en 2006 fue de 465000 toneladas, de los cuales el 20% fueron fosforados (PFRs) y el 10% bromados (BFRs).

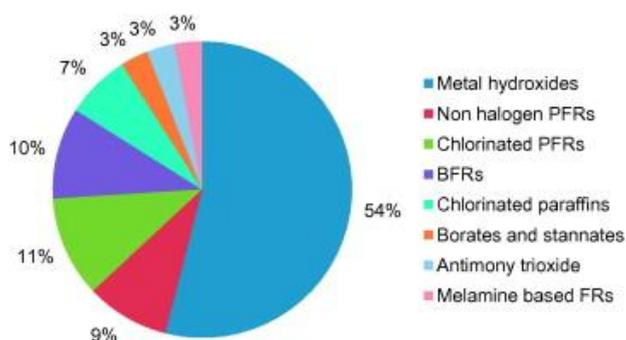


Fig. 1: Consumo de los diferentes tipos de FRs (CEFIC, 2007)

La relación de compuestos incluidos en el presente estudio se recoge en la **Tabla 1**. De los compuestos analizados, PFOS, NMeFOSA, NEtFOSA y NEtFOSE forman parte de los 21 compuestos o grupos de compuestos que el Convenio de Estocolmo recomienda vigilar en el aire ambiente para proteger la salud humana y el medio ambiente, por considerarlos Persistent Organic Pollutants (POPs). Además, los 3 isómeros del HBCD (α -HBCD, β -HBCD y γ -HBCD) forman parte de los compuestos que están siendo objeto de examen para ser incluidos en esta lista [15].

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha afirmado que muchos materiales ignífugos bromados son persistentes, bioacumulables y tóxicos para las personas y el medio ambiente. Se sospecha que provocan tanto efectos neurocomportamentales como alteraciones endocrinas y se ha detectado su presencia en la biota y el medio ambiente. Por esta razón, se emitió una recomendación el pasado 3 de marzo de 2014 sobre la vigilancia de los residuos de materiales ignífugos bromados en los alimentos. Se recomienda analizar, entre otros, los isómeros del hexabromociclododecano (HBCD) y el tetrabromobisfenol A (TBBPA) y sus derivados en los siguientes alimentos: pescados y otros productos de la pesca, carne y productos cárnicos, leche y productos lácteos, huevos y ovoproductos, y además los HBCDs en la leche de inicio y de continuación [16].

El hexabromociclododecano (HBCD) también se incluye en la lista de Persistente, Bioacumulativo y Tóxico (PBT) de la European Chemical Substance Information System [17].

A raíz de todo esto, en la Unión Europea la producción de BFRs está cada vez más restringida [12]. Esto ha facilitado el aumento del consumo de los PFRs tal y como se observa en la figura 1, así como la aparición de los llamados “nuevos” BFRs (NBFRs) para reemplazar los compuestos que se van prohibiendo [18]. Esto ha originado que se quiera saber de que modo los FRs llegan desde su objeto de aplicación al alimento, por lo que se quiere evaluar en que concentración se encuentran estos compuestos en el aire.

Desde el punto de vista toxicológico, los PFCs favorecen la aparición de tumores, son carcinogénicos y tienen efectos adversos en la reproducción humana [19]. Los BFRs actúan como si fuesen compuestos endocrinos que imitan las funciones hormonales, como los de la glándula tiroides [20]. Algunos PFRs, como el tricloroetilfosfato (TCEP) son teratogénicos y con potencial cancerígeno en ratones, por lo que se está estudiando su posible efecto carcinogénico en humanos. Además posee efecto hemolítico [21]. Otros son genotóxicos, como el trimetilfosfato (TMP) [22] o neurotóxicos, como el tri-n-propilfosfato (TnBP) o el trifenilfosfato (TPhP) [23].

Análisis en el aire ambiente

Para el análisis de FRs en aire ambiente se han descrito diversos métodos, con diferentes técnicas de extracción, purificación y determinación en función del tipo de FRs al cual se dirige el análisis. Un resumen de los métodos de análisis más recientes se muestran en la tabla 2.

- Extracción

La matriz de interés es el aire ambiente, de modo que todas las técnicas de captación están basadas en el uso de espuma de poliuretano (PUF) y resina polimérica (XAD-2) para la fase gaseosa y filtro de fibra de vidrio (GFF) y filtro de fibra de cuarzo (QFF) para la fase particulada.

En función del tipo de compuestos a analizar, los autores han escogido diferentes métodos de extracción para tratar de obtener los mejores resultados posibles.

En referencia a los PFCs, el método más utilizado es la extracción sólido-líquido, ya sea con éter de petróleo/acetona (1/1) y diclorometano [24] o bien con una mezcla al 50% de acetona y hexano [25].

Para la extracción de PFOSAs y PFOSEs el método predominante sigue siendo la extracción sólido-líquido. Como disolventes en este caso hay una mayor variedad, como el acetato de etilo [26-27] o una mezcla de éste junto a metanol [27-28]. Van Leeuwen et al. [27] también propone una extracción con una mezcla de éter de petróleo/acetona (1/1) junto con diclorometano, la misma que utilizaba en la extracción de los PFCs. Además también prueba la extracción en Soxhlet utilizando éter de petróleo como disolvente.

En el caso de los PFRs, debido a su variabilidad estructural, podemos encontrar un gran número de métodos de extracción diferentes para ellos.

Björklund et al. [29] propone una extracción sólido-líquido con diclorometano y Tollbäck et al. [30] se decanta por una mezcla de hexano/dietil éter (9:1, v/v). Saito et al. [32] prefiere realizar la extracción con sonicación utilizando como extractante acetona, mientras que Marklund et al. [5] extrae con diclorometano. Otro método muy utilizado es el soxhlet, ya sea con acetato de etilo [33], hexano/acetona (8:2) [34] o diclorometano [6]. Carlsson et al. [35] también utiliza diclorometano pero además lo combina posteriormente con ultrasonicación.

Otros métodos utilizados son la extracción con líquido presurizado (PLE) utilizando acetato de etilo [36-37], la extracción asistida por microondas (MAE) con acetona [38], la dispersión en matriz en fase sólida (MSPD) utilizando de disolvente acetona [39], la extracción dinámica asistida por microondas (DMAE-SPE) utilizando metanol [40] y la agitación con solvente realizando posteriormente una extracción líquido-líquido con diclorometano [41]. Estas últimas técnicas permiten la automatización del proceso reduciendo el consumo de disolvente y el tiempo de extracción.

Los BFRs se extraen por sólido-líquido según utilizando acetona [42] o una mezcla de hexano/dietil éter (4:1, v/v) con diclorometano [43]. Tollbäck et al. [31] también propone la extracción con ultrasonicación utilizando acetonitrilo. Qi et al. [44] por otra parte se decanta por el método soxhlet utilizando una mezcla de acetona/hexano (1/1) y diclorometano.

Tabla 2: Métodos de análisis de retardantes de fuego y PFCs en aire ambiente e interior.

MÉTODOS DE ANÁLISIS									
FRs	matriz	tipo de muestra ¹	Extracción ²	Disolvente	Purificación	separación	Columnas ³	detección	referencia
PFRs (TMP, TiPP, TnPP)	aire	GFF	sólido-líquido	DCM	-	GC	VF5-MS (30m X 0,25mm, 1µm)	NPD	Björklund, 2004 [29]
PFRs (TMP, TiPP, TnPP)	aire	GFF	sólido-líquido	DCM	-	GC	VF5-MS (30m X 0,25mm, 1µm)	PCI-CID-MS	Björklund, 2004 [29]
PFRs (TMP, TEP, TPP, TBP, TCPP, TCEP, TEHP, TBEP, TDCPP, TphP, TCP)	aire	GFF y disco SPE	sonicación	Acetona	-	GC	DB-17 (30m x 0,53mm, 1µm)	FPD	Saito, 2007 [31]
PFRs (TMP, TEP, TPP, TBP, TphP)	aire	Membrana C8 SPE	sólido-líquido	hexano/dietil eter (9:1, v/v)	-	HPLC (H ₂ O:MeOH)	Apollo C18 (250mm x 4,6mm, 5µm)	MS	Tollbäck, 2006 [30]
PFRs (TBP, TCEP, TCPP, TBEP, TPP, TEHP)	aire	PUF y GFF	soxhlet y ultrasonicación	DCM	lana de vidrio	GC	DB-5 (30m x 0,25mm, 0,2µm)	NPD	Carlsson, 1997 [34]
PFRs (TnBP, TCPP, TPP, TCEP, TBEP, TEHP)	aire	GFF	DMAE-SPE	Metanol	-	LVI-GC	DB-5 (30m x 0,25mm, 0,1µm)	NPD	Ericsson, 2003 [39]
PFRs	aire	GFF	soxhlet	DCM	evaporación hasta 2mL y purificación con 2,5mL sílica-gel al 10% en agua desactivada	GC	HP-5MS (30m x 20,25mm x 0,25 µm)	MS-EI	Möller, 2011 [7]
PFRs	polvo de interiores	GFF Y QFF	sonicación	DCM (2x25ml)	-	GC	-	NPD	Marklund, 2003 [6]
PFRs	polvo de interiores	GFF Y QFF	soxhlet	hexano/acetona, 8:2	-	GC	-	EI-MS	Ingerowski, 2001 [33]
PFRs	lodo	GFF Y QFF	soxhlet	Acetato de etilo	SPE (sorbente de sílica) más GPC	GC	-	EI-MS	Bester, 2005 [32]
PFRs	lodo	GFF Y QFF	PLE	Acetato de etilo (50mL)	GPC más SPE (sorbente de sílica)	GC	-	EI-MS	Marklund, 2005 [35]
PFRs	polvo de interiores	GFF Y QFF	MAE	Acetona (10mL)	SPE (Oasis HLB) más sílica	GC	-	NPD	García, 2007 [37]
PFRs	sedimento húmedo	GFF Y QFF	agitación con solvente	acetona más metanol (100+50mL)	Extracción L-L con DCM	GC	-	FPD	Kawagoshi, 1999 [40]
PFRs	polvo urbano y partículas al aire libre	GFF Y QFF	PLE	Acetato de etilo (8mL aprox)	Clean-up online con alumina	GC	-	NDP	Quintana, 2007 [36]
PFRs	polvo urbano y partículas al aire libre	GFF Y QFF	PLE	Acetato de etilo (8mL aprox)	Clean-up online con alumina	GC	-	PCI-MS/MS	Quintana, 2007 [36]
PFRs	polvo de interiores	GFF Y QFF	MSPD	Acetona (3mL)	Clean-up online con n-hexano y alumina	GC	-	NPD	García, 2007 [38]

MÉTODOS DE ANÁLISIS									
PFCs	Aire	PUF- XAD 2- PUF/GFF	sólido-líquido	éter petroleo/acetona (1/1) y DCM	lg Alumina	GC	DB-wax (30m × 0,25mm, 250µm)	MS-PCI	Shoeib, 2006 [24]
PFCs	Aire	XAD 2 y GFF	sólido-líquido	acetona/hexano	florisil	HPLC (2mM CH ₃ COONH ₃ :MeOH)	Zorbax Extend C18 (150mm×2.1mm, 5µm)	MS	Boulanger, 2005 [25]
PFCs	Aire	GFF	MAE	Metanol	centrifugación	HPLC (H ₂ O:MeOH) 5mMNH ₄ Ac	LUNA C18 (150mmx2mm, 5µm)	MS/MS	Beser, 2011 [44]
PFOSAs/PFOSEs	Aire	PUF- XAD 2- PUF/GFF	sólido-líquido	metanol y acetato de etilo	lana de vidrio	GC	DB-wax (30m × 0,25mm, 250µm)	MS-PCI (NCI)	Martin, 2002 [28]
PFOSAs/PFOSEs	Aire	PUF- XAD 2- PUF/GFF	sólido-líquido	Acetato de etilo	-	GC	DB-wax (30m × 0,25mm, 250µm)	MS-PCI	Jahnke, 2007 [26]
PFOSAs	Aire	PUF y GFF	sólido-líquido	éter petroleo/acetona y DCM	filtración	GC	DB-5 (60m x 0,25mm, 250µm)	MS-EI/NCI	Shoeib, 2004 [24]
FOSAs/FOSEs	Aire	PUF, XAD-2 y QFF	sólido-líquido	metanol y acetato de etilo	lana de vidrio	GC	-	NCI/PCI-MS	van Leeuwen, 2007 [27]
FOSAs/FOSEs	Aire	PUF y GFF	soxhlet	éter de petroleo	filtración	GC	-	EI/NCI-MS	van Leeuwen, 2007 [27]
FOSAs/FOSEs	Aire	PUF, XAD-2 y GFF	sólido-líquido	Acetato de etilo	-	GC	-	PCI-MS	van Leeuwen, 2007 [27]
BFRs	Aire	PUF-GFF	soxhlet	acetona:hexano (1:1) y DCM	SPE de sílica gel	GC	HP5-MS (30 m × 0,25 mm × 0,1 µm)	MS-NCI	Qi, 2014 [43]
HBCD	Aire	PUF y GFF	sólido-líquido	Acetona	H ₂ SO ₄ y sílica	GC	-	MS-ECD/EI	Remberger, 2004 [41]
TBBPA	Aire	GFF	sólido-líquido	hexano/dietil eter (4:1, v/v) y DCM	sílica	GC	HP5-MS (30m x 0,25mm, 0,25µm)	MS-EI/NCI	Xie, 2007 [42]
TBBPA	Aire	PUF y GFF	ultrasonicación	ACN	-	HPLC (10mM CH ₃ COONH ₃ :MeOH)	XterraMS C18 (150mm x 2,1mm, 3,5µm)	MS	Tollbäck, 2006 [31]

1- GFF: filtro de fibra de vidrio, QFF: filtro de fibra de cuarzo, PUF: espuma de poliuretano, XAD-2: resina polimérica

2- DMAE: extracción dinámica asistida por microondas, PLE: extracción con líquido presurizado, MAE: extracción asistida por microondas, MSPD: dispersión por matriz en fase sólida

3- -: no descrita

- Purificación

Algunos autores optan por no purificar los extractos que obtienen, evitando de ese modo la pérdida de algunos compuestos.

Los extractos de PFCs se purifican con alúmina [24] o florisil [25]. Los de PFOSAs y PFOSEs se purifican con lana de vidrio [28-27] o con filtración [24-27].

En el análisis de PFRs generalmente no se purifica el extracto [5-29-30-32-34-40]. Carlsson et al. [35] lo purifica con lana de vidrio y Möller et al. [6] con sílica-gel al 10% en agua desactivada. También se puede llevar a cabo mediante SPE seguido de GPC [33] en orden inverso, primero GPC y después SPE [36] o simplemente con SPE [38]. La ventaja que ofrecen estas técnicas, tanto SPE como GPC, es que pueden automatizarse, ahorrando así tiempo en la realización del análisis. Otra opción es llevar a cabo una purificación *online* con alúmina [37] o con n-hexano y alúmina [39].

En el caso de los BFRs, Xie et al. [43] purifica el extracto con sílica, Qi et al. [44] utiliza una extracción en fase sólida en columna de sílica-gel y Remberger et al. [42] ácido sulfúrico y sílica (**ver tabla 2**).

- Determinación

De acuerdo con los datos señalados en la **tabla 2**, el análisis se lleva a cabo mayoritariamente con cromatografía de gases debido a que la mayoría de los compuestos estudiados en el aire ambiente son apolares.

Sin embargo para las moléculas más polares y termolábiles es preferible la cromatografía líquida.

Se han descrito diferentes metodologías para la determinación de PFCs, tanto por HPLC (compuestos iónicos) como por GC (compuestos neutros). La separación cromatográfica utilizando equipos de HPLC-MS o HPLC-MS/MS se lleva a cabo mediante columnas cromatográficas de fase reversa como pueden ser una Zorbax Extend C18 150mmx2,1mm, 5µm o una columna LUNA C18, 150mmx2mm I.D., 5µm, según indican Boulanger et al. y Beser et al. en sus respectivos trabajos [25-45]. Las fases móviles que ambos utilizan son agua:metanol con acetato amónico a diferentes concentraciones, 2mM solo en agua para el primero y 5mM en ambas fases para el segundo.

Con el mismo método que Boulanger et al. [25] y con la misma columna también se pueden determinar los PFOSAs y PFOSEs según Martin et al. y Janhke et al. [26-28]. Shoeib et al. [24] sin embargo, realiza la determinación de las PFOSAs utilizando un GC-EI/NCI con DB-5 60mx0,25mm, 250µm.

En el caso de los PFRs, los métodos de determinación por excelencia son aquellos que son selectivos para el fósforo. El método más utilizado es el GC-NPD [5-37-38-39]. Carlsson et al. [35] y Ericsson et al. [40] lo combinan con una columna DB-5 30mx0,25mm, 0,2µm y Björklund et al. [29] con una VF5-MS 30mx0,25mm, 1µm. Otro método selectivo utilizado es el GC-FPD [41], en el cual se puede utilizar una DB-17 30mx0,53mm, 1µm [32].

El único método de confirmación que se utiliza mayoritariamente en estos compuestos es el GC-EI-MS [33-34-36], algunos con una columna HP-5MS 30mx0,25mm; 0,25 μ m [6]. Quintana et al. [37] utiliza un GC-PCI-MS/MS para mejorar los resultados de su análisis y Töllback et al. [30] decide realizar el análisis con HPLC-MS, utilizando una columna Apollo C18 250mmx4,6mm, 5 μ m y una fase móvil que consiste en agua:metanol sin ningún tipo de modificador.

En cuanto a la determinación de BFRs, en particular los HBCDs y el TBBPA, aunque existen varios estudios en los que utilizan GC-MS para su determinación con columnas genéricas como la HP5-MS de dimensiones 30mx0,25mm, 0,25 μ m [43] o 30mx0,25mm, 0,1 μ m [42-44], la técnica cromatográfica por excelencia es la cromatografía líquida, debido a que no son tan apolares como pudieran serlo otro tipo de BFRs. Töllback et al. [31] utiliza un HPLC-MS con una columna Apollo C18 250mmx4,6mm, 5 μ m y agua (10mM acetato amónico):metanol como fase móvil.

Por tanto, las fases móviles más utilizadas son H₂O:MeOH y H₂O:ACN, a las que se les añaden diferentes modificadores. El más utilizado es el NH₄Ac, (para todos los tipos de compuestos) en concentraciones que van desde 2 a 20mM en agua [8-9-46-47-48-49]. No obstante también se ha utilizado 1mM TFA (para PFRs) en agua [12] y 0.1% HCOOH (para PFRs y BFRs) en ambas fases [19-50].

Los compuestos objeto del presente estudio son sustancias polares para las cuales no existe en la bibliografía métodos escritos de análisis en el aire ambiente.

LC-HRMS

Las aplicaciones de métodos multiresiduos para el control de residuos y contaminantes en el ámbito ambiental se ha consolidado en los últimos años. Este enfoque permite evaluar la presencia de decenas de sustancias en una única muestra con una única inyección en el cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas. En este sentido la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría en tándem (LC-MS/MS) se ha afianzado, sobretodo en los ámbitos regulados, como la técnica de referencia para las sustancias más polares y termolábiles. Sin embargo esta metodología presenta algunas limitaciones para el análisis masivo de sustancias, básicamente vinculadas con el tiempo de análisis, la velocidad de scan y la sensibilidad. Estos inconvenientes pueden superarse mediante el uso de los instrumentos de espectrometría de masas de alta resolución y masa exacta (HRMS), tales como el TOF o el Orbitrap, que operan en full scan y que no presentan limitaciones (teóricas) en cuanto al número de compuestos que pueden ser analizados. En los últimos años la aparición de una nueva generación de equipos de alta resolución (TOF, Orbitrap) acoplados a la cromatografía líquida (LC-HRMS), está permitiendo abordar de una manera más eficiente el análisis de centenares de sustancias en una única inyección [50]. Estas plataformas proporcionan una elevada selectividad, derivada de la posibilidad de trabajar con masas exactas en ventanas de entre 1-5 ppm, y con altas resoluciones, en el rango de 25000-120000 FWHM, lo que permite una elevada eficacia en la resolución de compuestos isobáricos que coeluyen. Asimismo, su elevada sensibilidad, que supera las técnicas de LC-MS/MS cuando se trabaja con un número elevado de compuestos (<250) y que está también vinculada con la alta resolución que minimiza las interferencias de la matriz, los convierten en una herramienta muy útil para el análisis cuantitativo [52].

Estos instrumentos permiten combinar la búsqueda de sustancias previamente definidas (target), con una evaluación a posteriori (post-target) de nuevas sustancias no incluidas en la búsqueda inicial, así como de otras sustancias desconocidas (non-target), lo que multiplica su potencial analítico [53-54]. Otro de los beneficios de esta técnica es la posibilidad de realizar búsquedas de largas listas de compuestos (500-1000) sin necesidad de disponer de estándares de referencia, evitando así costes innecesarios y la gestión siempre compleja de mantener la integridad de mezclas de patrones de centenares de sustancias [51].

Algunas de las características de ambos instrumentos se detallan en la **tabla 3**.

Tabla 3: Características del TOF y el Orbitrap

	TOF	Orbitrap Exactive
Rango (<i>m/z</i>)	20 - 10,000	50 - 4000
Poder de resolución	50.000 (FWHM)	Hasta 140000 (FWHM)
Velocidad máxima de adquisición	20-40 scans/s	Más de 10 scans/s
Precisión	< 1ppm	Interna: < 1ppm RMS Externa: < 3ppm RMS
Sensibilidad	Hasta nivel de femtogramos	En modo full scan: 500 fg
Rango dinámico	Hasta 10 ⁵	10 ⁴
Cambio de polaridad		Puede realizar un ciclo completo en 1s (full scan en negativo y positivo)
Celda de colisión HCD		Fragmentación de todos los iones

Para llevar a cabo la asignación de cada señal y facilitar el proceso de identificación (confirmación), estos equipos permiten además la comparación entre el perfil isotópico teórico y el obtenido experimentalmente, lo cual resulta una herramienta adicional muy útil [54]. Por esta razón, las bases de datos contienen el tiempo de retención, la masa exacta y la masa ionizada de cada compuesto, o lo que es lo mismo, toda la información necesaria para poder aprovechar al máximo las características de los HRMS [50].

El analizador de masas Orbitrap esta basado en un dispositivo anterior de almacenamiento de iones, la trampa de Kingdon (1923), que emplea la captura orbital en un campo puramente electrostático. En este dispositivo, un cátodo de alambre (electrodo central) se une coaxialmente a través de un ánodo cilíndrico exterior (electrodo exterior) con electrodos planos encapuchados para encerrar el volumen de captura.

Se aplica una tensión de corriente continua entre el alambre y el cilindro produciendo un potencial entre los dos electrodos. Cuando se crea un ion dentro de la trampa o se introduce en ella perpendicular al alambre con suficiente velocidad, este adoptará una órbita estable alrededor del alambre (captura orbital) debido a la diferencia de potencial entre ambos electrodos [55].

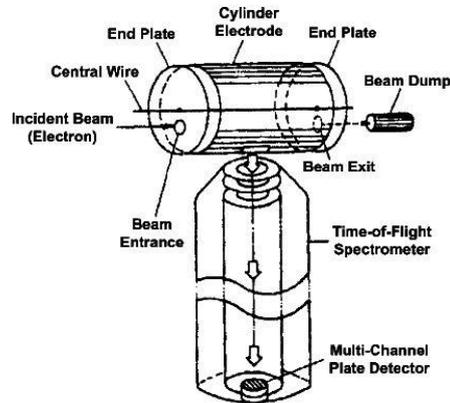


Fig. 2: Esquema de una trampa Kingdon acoplado a un TOF

En la actualidad, en el Orbitrap los iones son inyectados tangencialmente en un campo eléctrico donde tiene lugar el confinamiento orbital de estos alrededor de un electrodo axial mediante la aplicación de un campo electrostático. Los iones comienzan a girar alrededor del electrodo central y también a lo largo del mismo, moviéndose hacia delante y hacia atrás [58]. La frecuencia ω de estas oscilaciones armónicas a lo largo del eje z es independiente de la velocidad del ion, inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación m/z y directamente proporcional a la raíz cuadrada de la constante instrumental k :

$$\omega = \sqrt{\frac{q}{m}} \times k$$

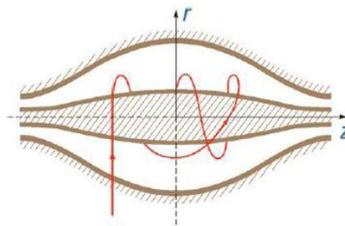


Fig. 3: Trayectoria de los iones en un Orbitrap

Las frecuencias de oscilación axial pueden ser detectadas directamente midiendo la corriente inducida entre los electrodos externos del Orbitrap. A la detección de banda ancha le sigue una rápida Transformada de Fourier (FFT) para convertir la señal en el dominio del tiempo en un espectro respecto a la relación m/z . La corriente inducida se amplifica y procesa exactamente del mismo modo para el FT-ICR, dando como resultado una sensibilidad y relación s/n similares.

Hay una menor pero importante distinción, y es que la dependencia de la raíz cuadrada con la frecuencia originada por la naturaleza electrostática del campo origina una disminución mucho más lenta del poder de resolución para iones con elevado valor de m/z .

Como resultado, el analizador Orbitrap debe superar el FT-ICR en este aspecto para iones por encima de una m/z concreta (típicamente, sobre 1000-2000 Th) [57]

El Orbitrap cuenta además con una C-Trap y una celda de colisión HCD (*high energy collision induced dissociation*). La C-Trap es un dispositivo de almacenamiento de iones intermedio que permite transferir los iones en paquetes directamente al analizador, o bien transferirlos primero a la celda HCD, que consiste en un multipolo recto en donde pueden ser fragmentados.

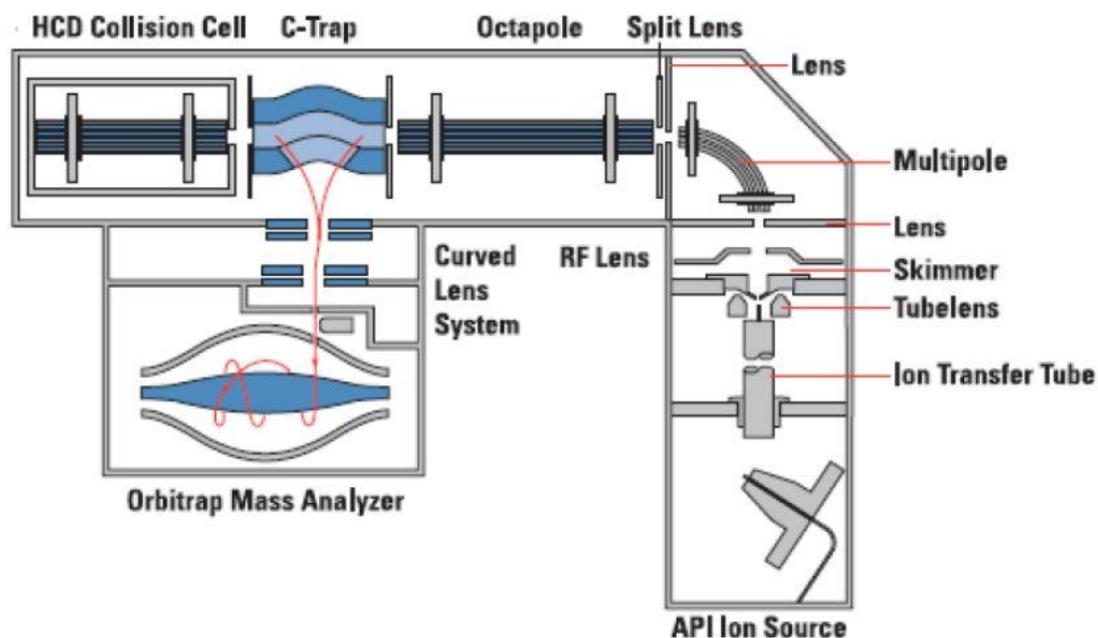


Fig. 4: Esquema general de un espectrómetro de masas de alta resolución Orbitrap-Exactive

Estos sistemas operan en el modo de adquisición de barrido completo (*full scan*), pero gracias a la celda HCD, también es posible trabajar realizando segundas rupturas, en un proceso que se podría denominar pseudoMS/MS (*all ions fragmentation*), puesto que se fragmenta todo lo que llega a la celda y no sólo el ion precursor como en un equipo MS/MS convencional [58].

Objetivo

El presente trabajo tiene como objetivo general el desarrollo de un método analítico para la determinación de retardantes de llama y compuestos perfluorados en el aire ambiente mediante LC-Orbitrap-HRMS.

Los objetivos específicos son:

1. Estudio de las condiciones cromatográficas
2. Optimización de la energía de colisión (celda HCD)
3. Diseño de la base de datos inicial para el análisis post-target
4. Optimización de la fuente de ionización mediante DoE
5. Selección de las condiciones de extracción
 - Seleccionar el método general
 - Determinar si existe efecto matriz
 - Determinar la recuperación obtenida
6. Validación
7. Realización de la base de datos definitiva para el análisis post-target
8. Análisis target y post-target de muestras reales

En este trabajo sólo se va a abordar los tres primeros puntos.

Metodología

- Reactivos y equipos

Los compuestos que se van a analizar se muestran en la **tabla 3**.

Los patrones individuales de los PFCs y BFRs fueron suministrados por Wellington Laboratorios Inc. (Guelph, Ontario, Canada) y los PFRs por Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). El acetonitrilo de grado LC-MS suministrado por VWR (Barcelona, España)

Para los patrones sólidos de PFRs se ha preparado una disolución individual de cada uno en acetonitrilo. A partir de ella se han ido realizando diluciones hasta obtener un mix con todos los compuestos fosforados utilizando como disolvente una mezcla de agua:acetonitrilo (80:20) a una concentración aproximada de 250ppb.

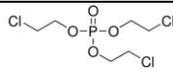
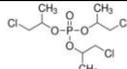
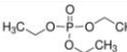
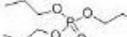
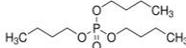
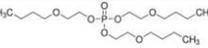
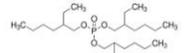
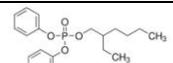
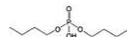
Para los PFCs y BFRs, puesto que eran líquidos, directamente se han realizado las diluciones necesarias para obtener 2 mix respectivamente en las mismas condiciones que el anterior.

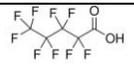
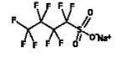
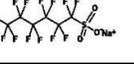
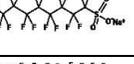
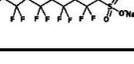
La separación cromatográfica se ha llevado a cabo con un sistema UHPLC Accela de cromatografía líquida equipado con una columna Hypersil Gold aQ (100 mm x 2.1 mm, 1.9 μ m) ambos de ThermoFisher Scientific (Bremen, Alemania).

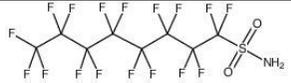
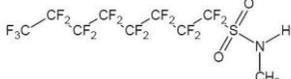
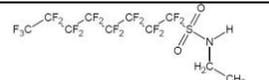
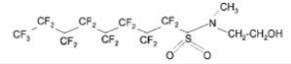
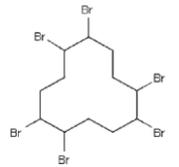
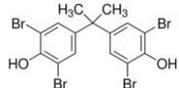
El análisis de masas se ha llevado a cabo con el analizador de espectrometría de masas de alta resolución Orbitrap ExactiveTM (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). Se ha utilizado un método genérico del laboratorio para las primeras fases de la optimización de la cromatografía. Posteriormente se llevará a cabo el diseño de experimentos y se adaptarán los parámetros.

El sistema está equipado con una interfase de ionización en electrospray *heated* (HESI-II). La detección se lleva a cabo alternando el modo de ionización positivo y el negativo (ESI+/ESI-) y utilizando los siguientes parámetros: voltaje del spray, 3.5kV en positivo y 2.50kV en negativo; gas de desolvatación (N₂ >95%), 50 (adimensional); voltaje *skimmer*, 25V en positivo y -25V en negativo; voltaje del capilar, 40V en positivo y -40V en negativo; temperatura de la fuente, 250°C; y temperatura del capilar, 270°C. Los datos fueron adquiridos alternando continuamente los eventos de scan: fragmentando y sin fragmentar (ambos desde 50 a 1000 Da), tanto para la ionización positiva como negativa. Para la fragmentación, todos los iones generados en la fuente del electrospray y recogidos en la C-trap fueron transferidos a la celda de colisión (HCD). La fragmentación ha tenido lugar a diferentes energías, que van comprendidas desde los 10 a los 40eV, después de lo cual los iones han vuelto a la C-trap y de allí han continuado al analizador de masas Orbitrap. El poder de resolución para ambos scans fue de 50000. Los datos han sido adquiridos utilizando el modo de calibración externo.

Tabla 1: Compuestos objeto de estudio (análisis target)

Tipo compuesto	Compuesto	Acrónimo	Composición elemental	Estructura	Polaridad
PFRS	Tris(2-chloroethyl)phosphate	TCEP	C6H12Cl3O4P		+
	Tris(2-chloroisopropyl)phosphate	TCPP	C9H18Cl3O4P		+
	Tris(2-chloro-1-(chloromethyl)ethyl)phosphate	TDCPP	C9H15Cl6O4P		+
	Trimethylphosphate	TMP	C3H9O4P		+
	Triethylphosphate	TEP	C6H15O4P		+
	Tri-n-propylphosphate	TPrP	C9H21O4P		+
	Tributylphosphate	TnBP	C12H27O4P		+
	Tris(2-butoxyethyl)phosphate	TBEP	C18H39O7P		+
	Tris(2-ethylhexyl)phosphate	TEHP	C24H51O4P		+
	2-Ethylhexyl diphenyl phosphate (technical)	EHDPP	C20H27O4P		+
	Triphenylphosphate	TPhP	C18H15O4P		+
	Tricresylphosphate	TCrP	C21H21O4P		+
	Di-n-butylphosphate	DnBP	C8H19O4P		+
Triisopropyl phosphate	TiPrP	C9H21O4P		+	

Tipo compuesto	Compuesto	Acrónimo	Composición elemental	Estructura	Polaridad
PFCs	Perfluoropentanoic acid	PFPeA	C5HF9O2		-
	Perfluorohexanoic acid	PFHxA	C6HF13O2		-
	Perfluoroheptanoic acid	PFHpA	C7HF17O2	$CF_3(CF_2)_4CF_2COOH$	-
	Perfluorooctanoic acid	PFOA	C8HF19O2	$CF_3(CF_2)_5CF_2COOH$	-
	Perfluorononanoic acid	PFNA	C9HF21O2	$CF_3(CF_2)_6CF_2COOH$	-
	Perfluorodecanoic acid	PFDA	C10HF23O2	$CF_3(CF_2)_7CF_2COOH$	-
	Perfluoroundecanoic acid	PFUdA	C11HF25O2	$HOOC-CF_2(CF_2)_8CF_3$	-
	Perfluorododecanoic acid	PFDoA	C12HF27O2	$CF_3(CF_2)_9CF_2COOH$	-
	Perfluorotetradecanoic acid	PFTeDA	C14HF31O2	$CF_3(CF_2)_{11}CF_2COOH$	-
	Sodium perfluoro-1-butanesulfonate	NaPFBS	C4F9O3S		-
	Sodium perfluoro-1-hexanesulfonate	NaPFHxS	C6F13SO3		-
	Sodium perfluoro-1-octanesulfonate	NaPFOS	C8F17O3S		-
	Sodium perfluoro-1-decanesulfonate	NaPFDS	C10F21SO3		-

Tipo compuesto	Compuesto	Acrónimo	Composición elemental	Estructura	Polaridad
PFOSAs	Perfluoro-1-octanesulfonamide	FOSA	C ₈ H ₂ F ₁₇ NO ₂ S		-
	N-methylperfluoro-1-octanesulfonamide	N-MeFOSA	C ₉ H ₄ F ₁₇ NO ₂ S		-
	N-ethylperfluoro-1-octanesulfonamide	N-EtFOSA	C ₁₀ H ₆ F ₁₇ NO ₂ S		-
PFOSEs	2-(N-methylperfluoro-1-octanesulfonamido)ethanol	N-MeFOSE	C ₁₁ H ₈ F ₁₇ NO ₃ S		-
BFRs	α -1,2,5,6,9,10-Hexabromocyclododecane	α -HBCDD	C ₁₂ H ₁₈ [79]Br ₃ [81]Br ₃		-
	β -1,2,5,6,9,10-Hexabromocyclododecane	β -HBCD	C ₁₂ H ₁₈ [79]Br ₃ [81]Br ₃		-
	γ -1,2,5,6,9,10-Hexabromocyclododecane	γ -HBCD	C ₁₂ H ₁₈ [79]Br ₃ [81]Br ₃		-
	Tetrabromobisphenol A	TBBPA	C ₁₅ H ₁₂ [79]Br ₂ [81]Br ₂ O ₂		-

- Procedimiento experimental

1. Verificación del HRMS-Orbitrap

Antes de realizar una secuencia, hay que comprobar el buen funcionamiento del equipo, por lo que se revisan algunos parámetros, como la presión del nitrógeno, los niveles de vacío, el nivel de aceite de las bombas y el estado general del equipo. También debe cambiarse el *transfer tube* y comprobar si es necesario limpiar el cono. Además de esto, una vez a la semana se calibra de forma externa con dos soluciones comerciales proporcionadas por Supelco, una para la calibración de la ionización en electrospray *heated* positiva (HESI+) y otra para la calibración de la ionización en electrospray *heated* negativa (HESI-).

Para la calibración en positivo se utiliza una mezcla de cafeína, L-methionyl-arginyl-phenylalanyl-alanine acetate×H₂O (MRFA) y Ultramark 1621 (una mezcla de *perfluoroalkoxycyclotriphosphazenes*) en una solución (acetonitrilo:metanol:agua) con un 1% de ácido acético. El espectro de masa característico se puede observar en la **figura 5** y en la **tabla 4** se indican las masas exactas que han de obtenerse.

Tabla 4: masas exactas para la calibración en modo de ionización positiva

	m/z
1	138.06619
2	195.08765
3	524.26496
4	1121.99702
5	1221.99064
6	1321.98425
7	1421.97786
8	1521.97148
9	1621.96509
10	1721.95870

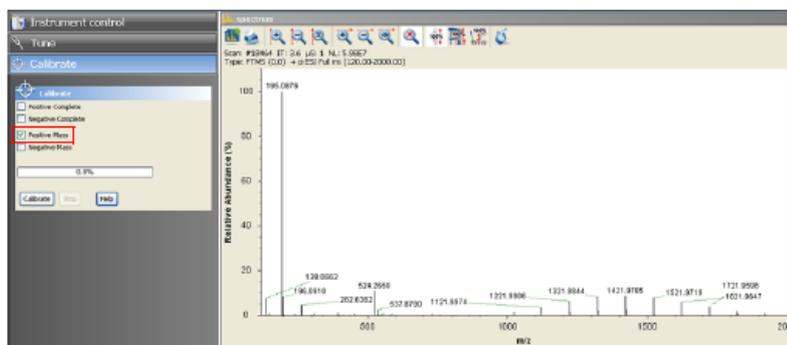


Fig. 5: Espectro de masas característico para la calibración en modo de ionización positiva

Para la calibración en negativo se utiliza una mezcla de *sodium dodecyl sulfate*, *sodium taurocholate* y Ultramark 1621 en una solución (acetonitrilo:metanol:agua) con un 1% de ácido acético. El espectro de masa característico se puede observar en la **figura 6** y en la **tabla 5** se indican las masas exactas que han de obtenerse.

Tabla 5: masas exactas para la calibración en modo de ionización negativa

	m/z
1	265.14790
2	514.28440
3	1279.99721
4	1379.99083
5	1479.98444
6	1578.97805
7	1679.97166
8	1779.96528

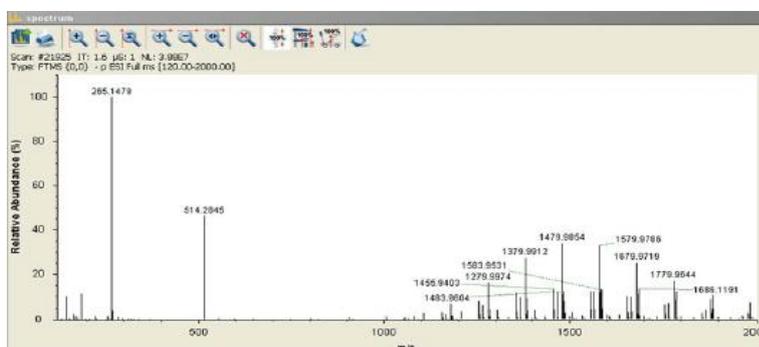


Fig. 6: Espectro de masas característico para la calibración en modo de ionización negativa

Previamente a cada secuencia de trabajo se puede realizar simplemente una verificación del ajuste de masa utilizando las disoluciones anteriores.

2. Acondicionamiento de la columna Hypersil Gold aQ (100 mm x 2.1 mm, 1.9 μm) en las condiciones iniciales del método.

3. Inyección de las muestras: En los distintos experimentos se han inyectado las mezclas mencionadas anteriormente, conteniendo una concentración aproximada de 250ppb de cada analito.

El flujo usado fue de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ y el volumen de inyección fue 10 μL . La separación se llevó a cabo utilizando un gradiente binario. La fase móvil era un gradiente de H_2O con 0.1% de CH_3COOH y 10 mM de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (A) y acetonitrilo con 0.1% de CH_3COOH y 10 mM de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (B). Las condiciones del gradiente son las siguientes: de 0-2 min, lineal con 80% de A, de 2-4 min lineal con 60% de A, de 4-6 min lineal con 50% de A, de 6-7 min lineal con 30% de A, de 7-9 min lineal con 20% de A, de 9-13 min lineal con 100% de A y de 13-15 min lineal con 80% de A. El tiempo total del análisis fue de 15 minutos. Las condiciones utilizadas en el equipo son las del método general explicado en el apartado anterior.

Resultados y discusión

1. Estudio de las condiciones cromatográficas

1.1 Columnas cromatográficas

Se han realizado pruebas con dos columnas de fase reversa Hypersild Gold, específicas de Thermo Fischer, que proporcionan mejoras en selectividad, resolución y formas de pico. Una de ellas es una columna C18 y la otra una C18 aQ. En esta última la fase estacionaria presenta un recubrimiento polar, con lo que según el fabricante aumentaría la retención de los compuestos polares, siendo adecuada para el análisis multiresiduo de un amplio rango de polaridades. Como se observa en la **tabla 6**, no hay diferencias significativas en los tiempos de retención, aunque los mayores valores son para la columna C18 aQ. El tiempo total del análisis es de 15 minutos.

Tabla 6: Tiempo de retención de los analitos en ambas columnas

Tiempo de retención (min)			Tiempo de retención (min)		
Compuesto	C18 aQ	C18	Compuesto	C18 aQ	C18
PFPeA	3,92	3,56	TMP	1,32	1,26
PFHxA	4,73	4,32	TEP	3,88	3,56
PFHpA	5,54	5,04	TCEP	5,4	5,01
PFOA	6,48	5,73	TiPrP	6,07	5,66
PFNA	7,23	6,52	TnPrP	6,71	6,27
PFDA	7,81	7,12	TCPP	7,35	6,89
PFUdA	8,28	7,58	TDCPP	-	-
PFDoA	8,74	7,99	TPhP	8,71	8,37
PFTeDA	9,64	8,8	TnBP	8,8	8,42
PFBS	4,88	4,32	DnBP	8,8	8,42
PFHxS	6,82	5,82	TBEP	9,24	8,75
PFOS	8,02	7,21	TCrP	9,99	9,55
PFDS	8,95	8,02	EHDPP	10,54	10,01
FOSA	9,23	8,69	TEHP	12,76	12,33
N-MeFOSA	9,99	9,42			
N-EtFOSA	10,31	9,71			
N-MeFOSE	9,82	9,33			

En las **figuras 7 y 8** se puede observar que las áreas obtenidas con la columna C18 aQ son mayores para todos los compuestos, por lo que se determina que es la columna adecuada para la realización del análisis. La fase móvil utilizada en este caso es H₂O (10mM CH₃COONH₄ y 0,1% CH₃COOH):ACN (10mM CH₃COONH₄ y 0,1% CH₃COOH) con un gradiente inicial de 80:20.

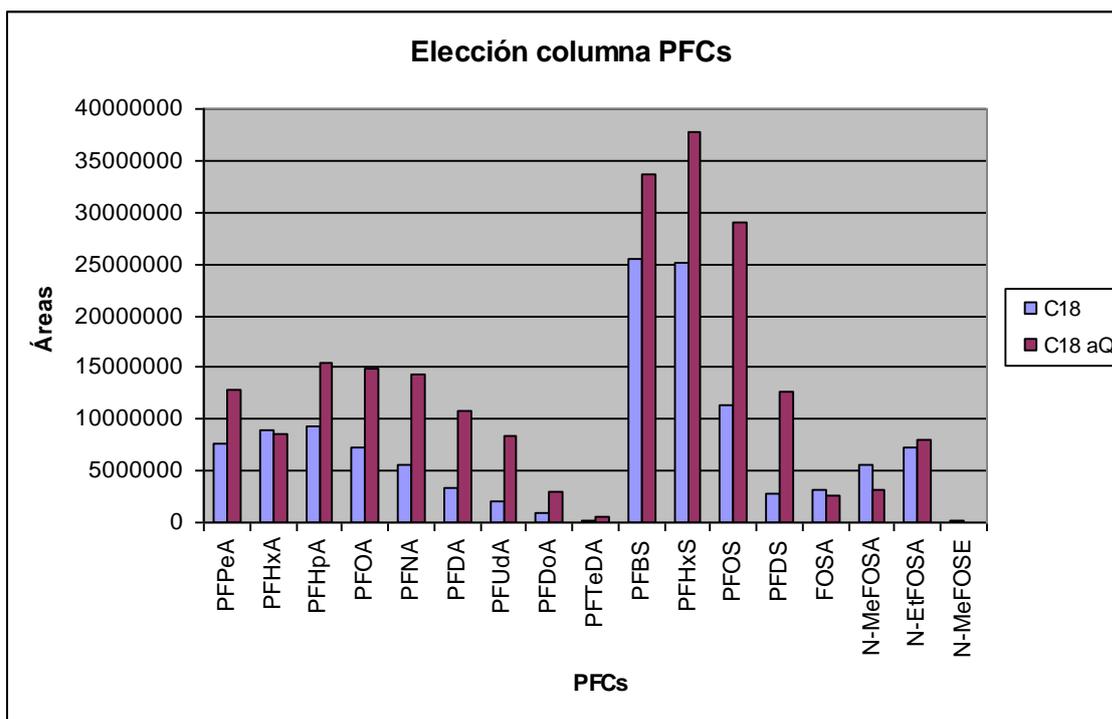


Fig. 7: Áreas obtenidas en los PFCs utilizando las distintas columnas

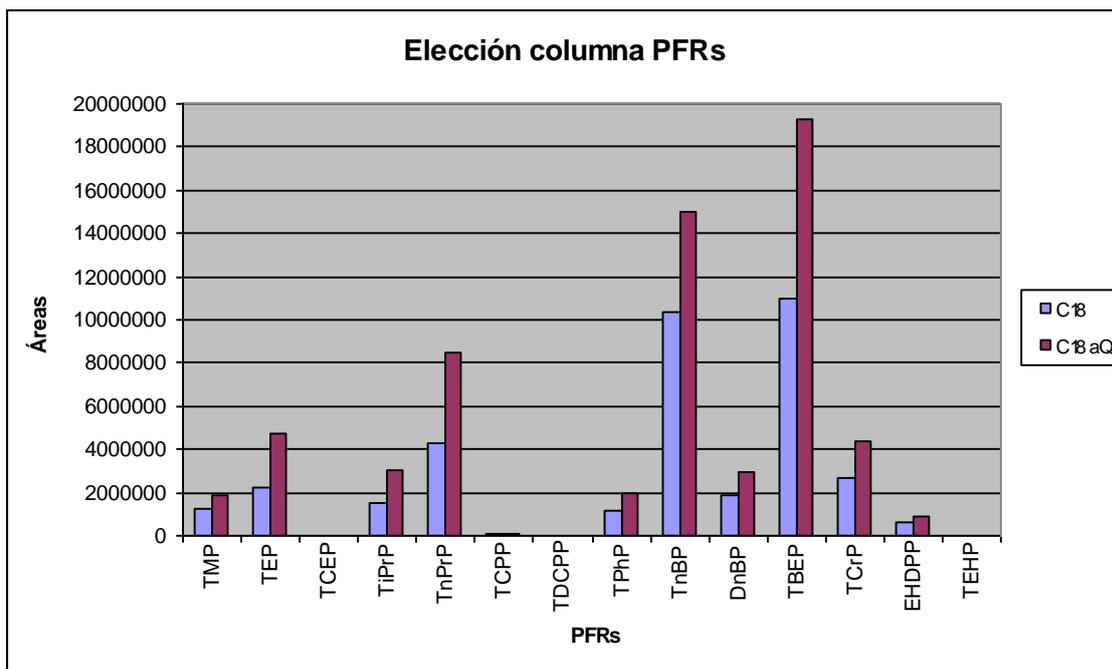


Fig. 8: Áreas obtenidas en los PFRs utilizando las distintas columnas

1.2 Fases móviles

Se han escogido 5 fases móviles diferentes:

- H₂O (5mM CH₃COONH₄):ACN
- H₂O (20mM CH₃COONH₄):ACN
- H₂O (10mM CH₃COONH₄ y 0,1% CH₃COOH):ACN (10mM CH₃COONH₄ y 0,1% CH₃COOH)

- H₂O (0,1% CH₃COOH):ACN (0,1% CH₃COOH)
- H₂O (10mM CH₃NH₄ y 0,1% HCOOH):ACN (10mM CH₃NH₄ y 0,1% HCOOH)

En todos los casos se ha utilizado un gradiente general con condiciones iniciales 80:20 (H₂O:ACN). Para realizar la comparación de los resultados se han preparado mezclas con patrones de estos compuestos con una concentración aproximada de 250ppb.

El mayor problema ha sido conseguir una buena sensibilidad para todos los compuestos, ya que en todos los artículos consultados se basan en la determinación de sustancias en modo de ionización positiva o negativa, mientras que en este caso hay de ambos tipos.

Tras analizar los analitos con las diferentes fases móviles se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- El compuesto NMeFOSE sólo ha dado respuesta cuando se utilizan fases móviles que contienen CH₃COONH₄, ya que forma un aducto con el acetato y es la señal que se observa. Si no forma el aducto no se puede identificar, de modo que las fases móviles que no contienen acetato, como H₂O (0,1% CH₃COOH):ACN (0,1% CH₃COOH) y H₂O (10mM CH₃NH₄ y 0,1% HCOOH):ACN (10mM CH₃NH₄ y 0,1% HCOOH) se han descartado.

- Entre las fases móviles de 5mM y 20 mM de CH₃COONH₄ respectivamente, los resultados obtenidos son similares, pero un poco superiores en la de 5mM, por lo que de estas dos sería preferible utilizar esta.

- Finalmente, la elección de la fase móvil se resume a la que contiene 5mM de CH₃COONH₄ en agua y la que contiene 10mM CH₃COONH₄ y 0.1% de CH₃COOH en ambas fases. Como se puede observar en las **figuras 9 y 10**, en los PFCs y PFASs se obtienen mayores áreas con la primera, mientras que en los PFOSAs, PFOSEs y BFRs se obtienen con la segunda. En el caso de los PFRs, son muy similares, siendo ligeramente superiores en la mayoría de los compuestos las áreas con 5mM de CH₃COONH₄. Llegados a este punto, podemos concluir que ninguna de las dos fases móviles es la ideal para todos los compuestos, por lo que a la hora de escogerla, se llegará a un compromiso para poder obtener los mejores resultados posibles. El criterio escogido ha sido tener en cuenta las áreas de los compuestos con menor respuesta, puesto que son los que se ven más afectados por el cambio. Estos compuestos son TBBPA, PFOSAs y PFOSEs, y sus áreas son mayores en la fase móvil que contiene CH₃COONH₄ tanto en el H₂O como en el ACN y un pequeño porcentaje de ácido acético. El hecho de que la respuesta sea mayor en estos compuestos de ionización negativa probablemente no sea debido a la presencia del ácido, sino a la del CH₃COONH₄ en ambas fases. El ácido es más favorable para los PFRs, que se ionizan en modo de ionización positiva. Por tanto, la fase móvil que se ha escogido para realizar la separación de los compuestos es 10mM CH₃COONH₄ y 0,1% CH₃COOH en H₂O y ACN.

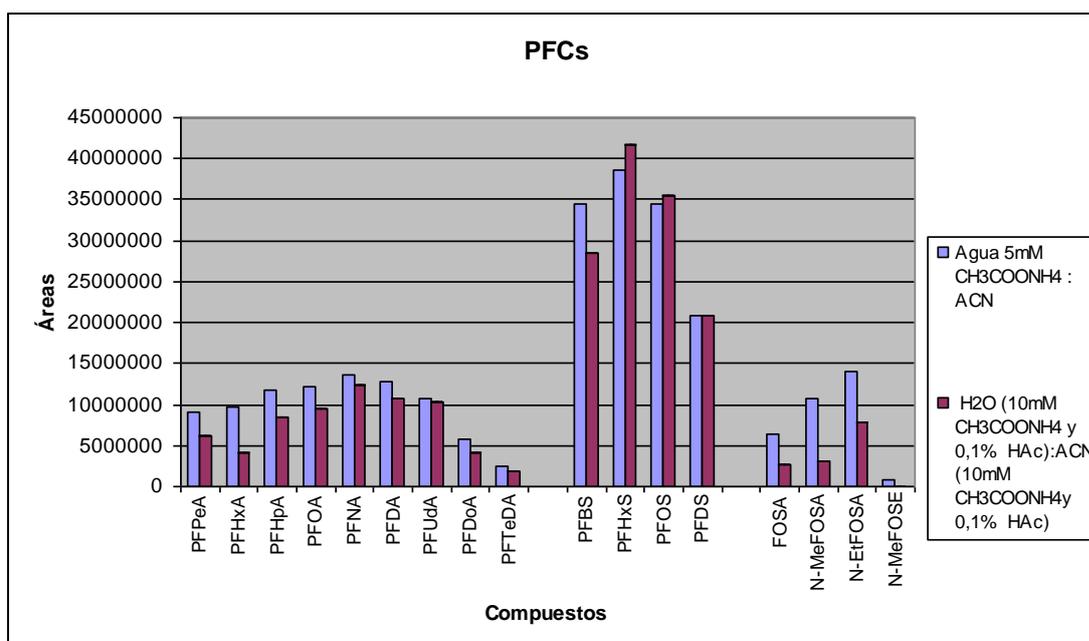


Fig. 9: comparación de las áreas de los PFCs con las dos fases móviles

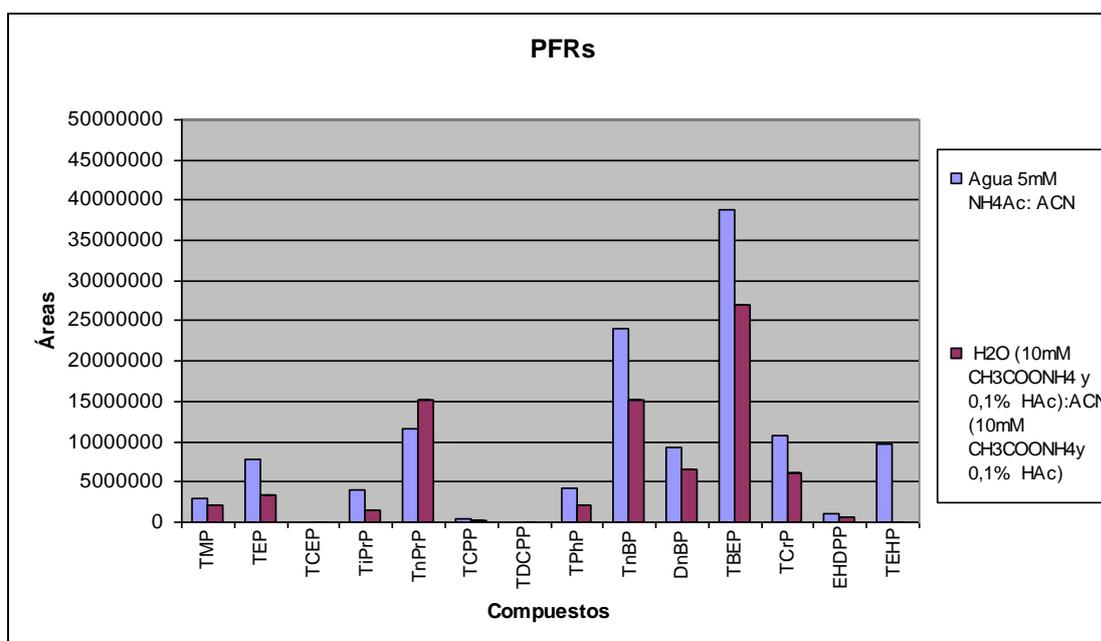


Fig. 10: Comparación de las áreas de los PFRs con las 2 fases móviles

El compuesto HBCD no se ha tenido en cuenta a la hora de escoger la fase móvil debido a que no se ha logrado separar sus isómeros α , β y γ con ninguna de ellas. Para intentar identificarlos se han analizado 3 patrones individuales de HBCD α , β y γ para poder comparar los resultados. Las áreas de estos últimos son muy pequeñas, pero las mejores se han obtenido en presencia de ácido en la fase móvil, por lo que la fase móvil escogida es adecuada para ellos. Por otra parte, el TDCPP no da señal debido a su baja sensibilidad. En otras pruebas realizadas por separado y con mayor concentración si que se ha obtenido señal. Se espera que cuando se optimice la fuente de ionización y el espectrómetro de masas sí que se pueda obtener señal a esta concentración.

Algunos de los cromatogramas obtenidos con la fase móvil escogida se encuentran en el **anexo I**.

2. Optimización de la energía de colisión (fragmentación) de la celda HCD

A diferencia de un analizador convencional (cuadrupolo, triple cuadrupolo, trampa iónica) de baja resolución, que registran masas nominales (200, 201 ...), los analizadores Orbitrap (R=50000) registran las masas monoisotópicas con una exactitud inferior a 5 ppm. Sin embargo esta exactitud de masa, junto con el tiempo de referencia no se considera suficiente para la confirmación de una sustancia. Aunque todavía existe bastante discusión al respecto, los criterios de confirmación que recomienda para plaguicidas la SANCO 12571/2013 [59] en la alta resolución son:

- 2 o más iones diagnóstico (ion molecular y un fragmento)
- Exactitud de masa para los 2 iones diagnóstico < 5 ppm
- Tiempo de retención del estándar = tiempo de retención del analito +/- 0,2 min
- *Pattern* isotópico similar al teórico
- *Ion ratio*

Teniendo en cuenta estos criterios se ha tratado de obtener fragmentos de cada ion target mediante el uso de la celda de colisión (HCD) y la optimización de su voltaje.

Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los iones precursores de cada compuesto, sus transiciones en LC-MS/MS y los productos que deben obtenerse teóricamente de cada uno de ellos. La diferencia principal entre un analizador MS/MS y el Orbitrap es que en los primeros se puede aislar un ion característico (ion precursor) y obtener los iones producto, mientras que en la celda de HCD del Orbitrap no se realiza una selección del ion precursor, sino que se produce una fragmentación de todos los iones que entran en la celda.

Generalmente en la HCD los iones moleculares se fragmentan generando el mismo *pattern* que en un triple cuadrupolo. Conocidos estos fragmentos, su masa exacta y el tiempo de retención (el mismo para el ion molecular y el fragmento) logramos identificar el compuesto.

En la **tabla 7** se adjuntan los iones moleculares y fragmentos de cada uno de ellos. Hasta ahora solo se ha realizado el análisis para los de ionización en modo positivo, por lo que el resto de los valores son teóricos.

Tabla 7: Iones moleculares y fragmentos de los compuestos analizados

Tipo compuesto	Acrónimo	Polaridad	Masa monoisotópica	[M+H] ⁺	[M-H] ⁻	Fragmento 1	Fragmento 2	Fragmento 3	Fragmento isotópico
PFCAs	PFPeA	-	263,98328	-	262,97601	218,98618			
	PFHxA	-	313,98009	-	312,97281	268,98298			
	PFHpA	-	363,97690	-	362,96962	168,98937			
	PFOA	-	413,97370	-	412,96643	368,97660	168,98937		
	PFNA	-	463,97051	-	462,96323	218,98618			
	PFDA	-	513,96732	-	512,96004	118,99256			
	PFUdA	-	563,96412	-	562,95684	518,96702	268,98298		
	PFDoA	-	613,96093	-	612,95365	568,96382	168,98937		
	PFTeDA	-	713,95454	-	712,94726	668,95743	168,98937		
	NaPFBS	-	298,94244	-	298,94299	79,95736			
	NaPFHxS	-	398,93606	-	398,93660	79,95736			
	NaPFOS	-	498,92967	-	498,93022	79,95736			
	NaPFDS	-	598,92328	-	598,92383	79,95736			
PFOsAs	FOSA	-	498,95348	-	497,94620	77,96552			
	N-MeFOSA	-	512,96913	-	511,96185	168,98937	218,98618		
	N-EtFOSA	-	526,94878	-	525,97750	168,98937	218,98618		
PFOSEs	N-MeFOSE	-	556,99534	-	616,00919	59,01385			
OPFRs	TMP	+	140,02385	141,03112	-	109,00491			
	TEP	+	182,07080	183,07807	-	98,98417	155,04667		
	TCEP	+	283,95388	284,96116	-	98,98417			286,9582
	TiPrP	+	224,11775	225,12502	-	98,98417	141,03112	183,07807	
	TPrP	+	224,11775	225,12502	-	98,98417	141,03112	183,07807	
	TCPP	+	326,00083	327,00811	-	98,98417			329,00515
	TDCPP	+	427,88391	428,89119	-	98,98417			
	TPhP	+	326,07080	327,07807	-	153,06988	251,04677		
	TnBP	+	266,16470	267,17197	-	155,04667	98,98417		
	DnBP	+	210,10210	211,10937	-	155,04667	98,98417		
	TBEP	+	398,24334	399,25062	-	199,07299	98,98417		
	TCrP	+	368,11775	369,12502	-	-			
	EHDPP	+	362,16470	363,17197	-	251,04677			
	TEHP	+	434,35250	435,35977	-	98,98417			
BFRs	α-HBCDD	-	635,65082	-	640,63746	78,91889			
	β-HBCD	-	635,65082	-	640,63746	78,91889			
	γ-HBCD	-	635,65082	-	640,63746	78,91889			
	TBBPA	-	525,48299	-	542,47571	78,91889			

Nota: Los valores en negrita corresponden a los fragmentos obtenidos experimentalmente en la celda HCD con un voltaje de 10 eV, los otros valores son teóricos.

Se ha realizado el análisis con diferentes voltajes en la celda HCD, y fragmentando o sin fragmentar en la misma celda, para comprobar los valores en los que los iones moleculares ($[M+H]^+$, $[M-H]^-$) y los fragmentos nos proporcionan las mejores respuestas. De este modo también se comprueba que la fragmentación hallada en la bibliografía es la que se corresponde con los compuestos.

Aunque existen fragmentos comunes para varios compuestos, ya que presentan estructura similar, con la separación cromatográfica es posible diferenciarlos. No es el caso del DnBP y TnBP, ya que eluyen al mismo tiempo de retención, y aunque poseen iones moleculares $[M+H]^+$ diferentes, comparten dos fragmentos característicos, por lo que se debe comprobar analizando los patrones individuales de ambos, si alguno de estos fragmentos es específico de uno de estos compuestos o si son la suma de ambos.

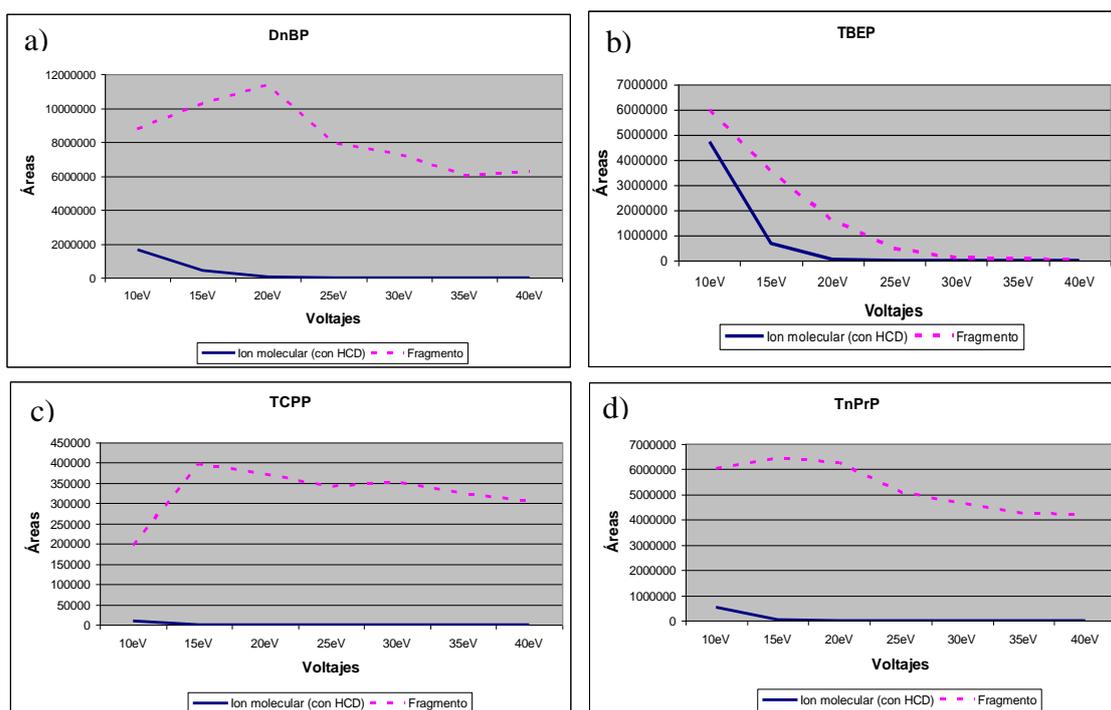


Fig. 11: Ion molecular y fragmento obtenidos con la celda HCD a diferentes voltajes (de 10 a 40 eV). a) DnBP, b) TBEP, c) TCPP, d) TnPrP

En la **figura 11** se observa como a medida que aumenta la energía de la celda HCD, el área del ion molecular disminuye mientras que la del fragmento aumenta, hasta que empieza a fragmentarse éste también y va disminuyendo el área de este fragmento. El punto máximo del fragmento corresponde a la energía óptima para la fragmentación de este compuesto. Se ha elegido como voltaje óptimo 10 eV ya que con este voltaje, se obtienen, en principio, mayores respuestas tanto para el ion molecular como para el fragmento en la mayoría de los compuestos.

A modo de ejemplo, en la **figura 12** se muestran los cromatogramas de ión extraído (XIC) del TCEP y del TBEP. Se pueden observar los iones moleculares de cada uno de ellos para su identificación, y para su confirmación, en el caso del TCEP un ion molecular $M+2$ (^{37}Cl) y en el caso del TBEP un fragmento característico.

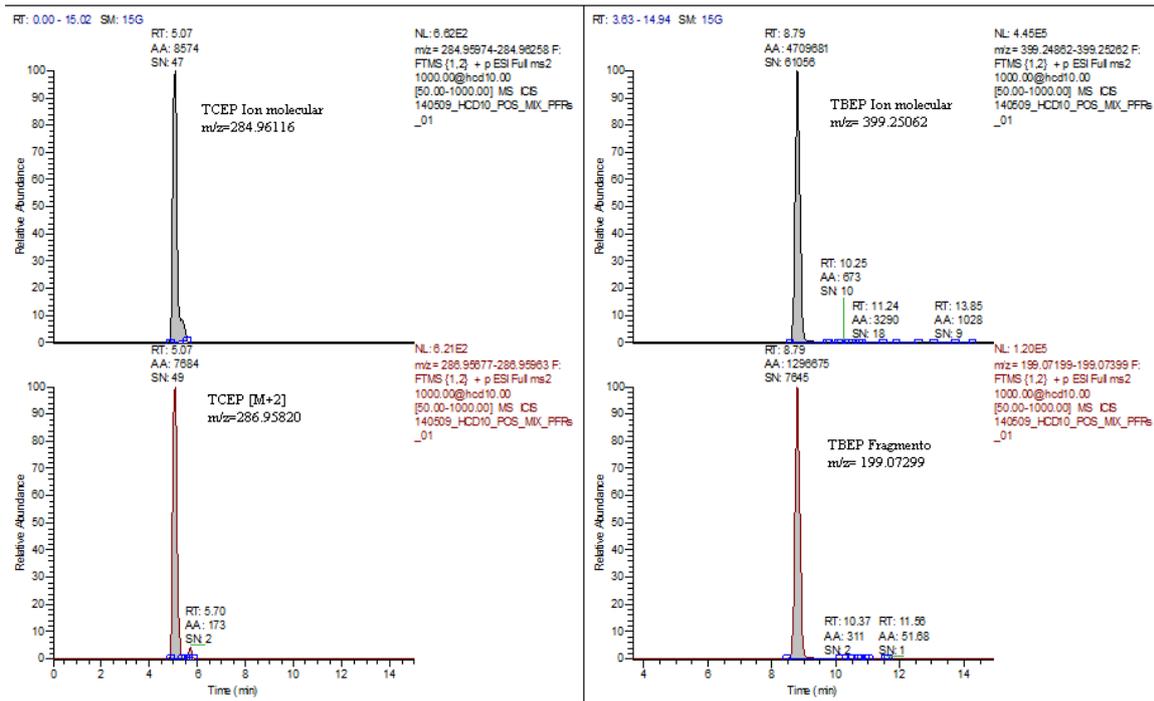


Fig. 12: Cromatogramas (Extracted Ion chromatogram, XIC) obtenidos para el TCEP y el TBEP

En el caso del TPhP y EHDPP, se han obtenido los mismos fragmentos para ambos debido a que presentan estructuras similares (solo poseen un radical diferente en su estructura molecular), aunque se ha logrado su separación cromatográfica. Se pueden ver en la figura 13.

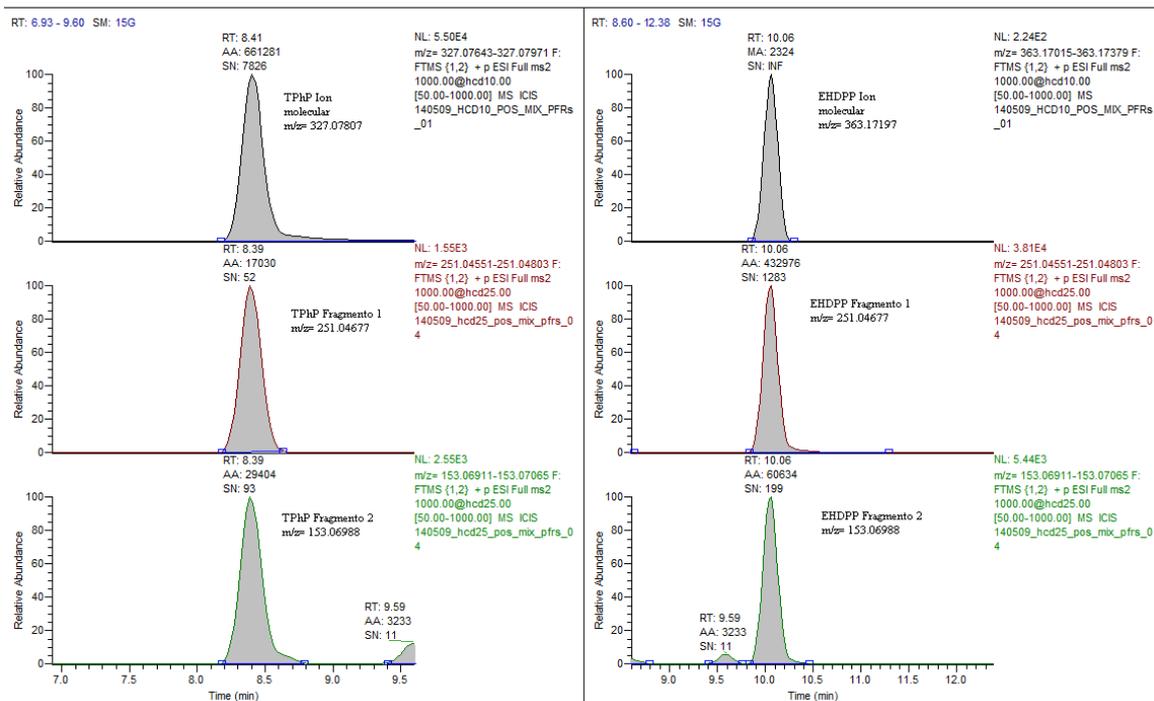


Fig. 13: Cromatogramas (XIC) obtenidos para el TPhP y EHDPP

Se ha dado también el caso de unos pocos compuestos que se han fragmentado directamente en la fuente de ionización (sin pasar por la HCD). En este caso la identificación se ha realizado gracias a los diferentes iones moleculares y a que eluyen a diferentes tiempos de retención.

Como se puede ver en la **figura 14**, el ion molecular del TEP comparte masa con los fragmentos 1 del TiPrP y TnPrP ($m/z = 183.07807$). Su fragmento 1 ($m/z = 155.04557$) coincide con el fragmento 1 del TnBP y su fragmento 2 ($m/z = 98.98417$) coincide con los fragmentos 3 del TiPrP y TnPrP y con el fragmento 2 del TnBP. Además el fragmento 2 de TiPrP y TnPrP ($m/z = 141.03112$) coincide con el ion molecular del TMP (no incluido en el cromatograma).

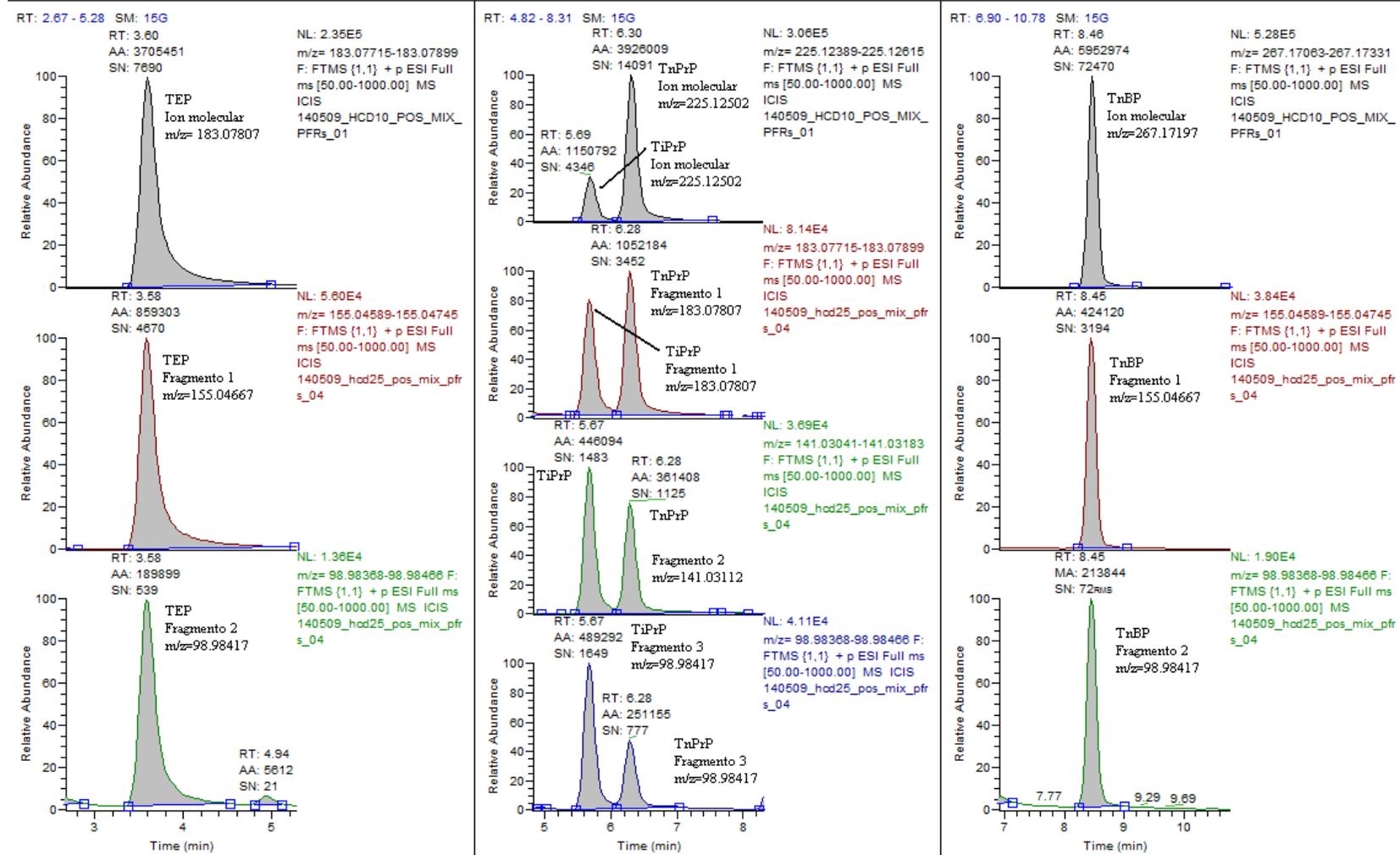


Fig.14: Cromatogramas (XIC) obtenidos para el TEP, TiPrP, TnPrP y TnBP.

3. Base de datos inicial para el análisis post-target

Para el análisis post target se requiere construir una base de datos (BD), (**tabla 8**) que permita al software procesar las muestras y confrontar las señales con la BD de modo que se identifiquen los iones que cumplen los criterios de identificación previamente definidos.

Estos compuestos pueden hallarse también en las muestras, de modo que se va a realizar un análisis post-target para determinar si se encuentran o no presentes. Se van a poder determinar pero no cuantificar, aunque si se encuentran frecuentemente en las muestras, sería adecuado conocer su concentración y realizar un muestreo para saber si existe algún riesgo para la salud. Este es uno de los motivos por la que la HRMS está despertando un mayor interés en estos últimos años [51]. Posteriormente esta tabla se completará con más fragmentos y los aductos de cada uno de ellos.

Tabla 8: Base de datos inicial de los compuestos post-target

Tipo	Compuesto	Abreviatura	Composición elemental	Masa exacta
OPFRs	Tripenyl phosphate	TpeP	C16H33O4P	320,21219
	Tri-iso-butyl phosphate	TiBP	C12H27O4P	266,16524
	Triphenyl phosphine oxide	TPPO	C24H51O4P	434,35304
	Tetraethyl ethylene diphosphonate	TEEdP	C10H24O6P2	302,10536
	Dibenzyl phosphate	DbzP	C14H15O4P	278,07134
	Diphenyl phosphate	DphP	C12H18O4P	257,09482
	Di(2-ethylhexyl) phosphate	DEHP	C16H36O4P	323,23567
PFAPAs	Perfluorohexyl phosphonic acid	PFH _x PA	C6H2F13PO3	399,95395
	Perfluorooctyl phosphonic acid	PFOPA	C8H2F17PO3	499,94646
	Perfluorodecyl phosphonic acid	PFDDPA	C10H2F21PO3	599,94117
PFASs	Potassium perfluoro-1-heptanesulfonate	PFHpS	C7F15SO3-	448,93231
FTSA	6:2 Fluorotelomer sulfonate	6:2 – FTSA	C8F13H5SO3	426,96790
	1H,1H,2H,2H-Tetrahydroperfluorooctane sulfonic acid	TH-PFOS	C8H6F13O3S	428,98355
PFASis	Sodium perfluorohexane sulfinatate	PFH _x Si	C6F13SO2Na	405,93146
	Sodium perfluoro-1-octanesulfinate	PFOSi	C8F17SO2-	482,93421
	Sodium perfluorodecane sulfinatate	PFDSi	C12F25SO2Na	705,91230
FOSAs	N-methyl perfluorobutane sulfonamide	MeFBSA	C5H3F9NO2S	311,97463
FOSEs	N-methyl perfluorobutane sulfonamido ethanol	MeFBSE	C7H8F9NO3	357,00867
	N-ethyl perfluorooctane sulfonamido ethanol	N-EtFOSE	C12H10F17NO3S	571,01154
PFCAs	Perfluorobutanoic acid	PFBA	C4HF7O2	213,98703
	Perfluoropentanoic acid	PFPA	C5HF9O2	263,98383
	Perfluorohexanoic acid	PFH _x A	C6HF11O2	313,98064
	Perfluoroheptanoic acid	PFHpA	C7HF13O2	363,97744
	Perfluorooctanoic	PFOA	C8HF15O2	413,97425
	Perfluorononanoic acid	PFNA	C9HF17O2	463,97106
	Perfluorodecanoic acid	PFDA	C10HF19O2	513,96786
	Perfluoroundecanoic acid	PFUnA	C11HF21O2	563,96467
	Perfluorododecanoic acid	PFDoA	C12HF23O2	613,96148
	Perfluoro tridecanoic acid	PFTTrDA	C13HO2F25	663,95828
	Perfluoro tetradecanoic acid	PFTeDA	C14HO2F27	713,95509
	Perfluorohexadecanoic acid	PFH _x DA	C16HF31O2	813,94870
	Perfluorooctadecanoic acid	PFOcDA	C18HF35O2	913,94231
	7H – Perfluoroheptanoic acid	7H – PFHpA	C7H2F12O2	345,98687

Conclusiones

1. Debido a su gran potencial para el análisis masivo de sustancias, mediante combinación del análisis target y post-target, y su capacidad para el análisis retrospectivo, la bibliografía refleja un mayor número de aplicaciones de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución, en los campos de seguridad alimentaria y control ambiental.
2. Del estudio de las condiciones cromatográficas se ha concluido que la columna Hypersil Gold aQ y la fase móvil 10mM CH₃COONH₄ y 0,1% CH₃COOH en Agua y ACN son las adecuadas para el análisis de retardantes de fuego fosforados y compuestos perfluorados.
3. Una energía de 10eV proporciona una fragmentación óptima para la mayoría de los compuestos manteniendo una elevada intensidad del ion molecular.
4. Para el análisis post-target es necesario crear una base de datos amplia, con las diferentes clases de compuestos que puedan estar presentes en el aire ambiente incluyendo otros tipos de sustancias como plaguicidas y sus metabolitos o PAHs, e incorporando a la misma toda la información disponible (masa monoisotópica, fragmentos, aductos...).
5. El siguiente paso será obtener los fragmentos característicos de todos los compuestos y resolver los pequeños problemas cromatográficos que quedan aún con los retardantes de llama bromados. Después de eso se optimizará la fuente de ionización, se seleccionaran las condiciones de extracción y se procederá a realizar pruebas con matrices reales.

Bibliografía

- [1] Wilkie C.A., Morgan A.B. (eds.) Fire Retardancy of Polymeric Materials, 2ed., CRC, 2009
- [2] World Health Organization, Environmental Health Criteria 192: Flame Retardants: A General Introduction. Geneva, Switzerland, 1997
- [3] Bergman A. Rydén A. Law R.J. de Boer J. Covaci A. Alae M. Birnbaum L. Petreas M. Rose M. Sakai S. Van den Eede N. van der Veen I., 2012. A novel abbreviation standard for organobromine, organochlorine and organophosphorus flame retardants and some characteristics of the chemicals. *Environment International* 49, 57–82
- [4] Lacina O. Hradkova P. Pulkrabova J. Hajslova J., 2011. Simple, high throughput ultra-high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry trace analysis of perfluorinated alkylated substances in food of animal origin: Milk and fish. *Journal of Chromatography A* 1218, 4312
- [5] Alae M. Arias P. Sjodin A. Bergman A., 2003. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment International* 29, 683-9
- [6] Covaci A. Harrad S. Abdallah M. Ali N. Law R.J. Herzke D. de Wit CA, 2011. Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment International* 37, 532-556
- [7] Marklund A. Andersson B. Haglund P., 2003. Screening of organophosphorus compounds and their distribution in various indoor environments. *Chemosphere* 53, 1137–1146
- [8] Möller A. Xie Z. Caba A. Sturm R. Ebinghaus R., 2011. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in the atmosphere of the North Sea. *Environmental Pollution* 159, 3660
- [9] Bollmann U.E. Möller A. Xie Z. Ebinghaus R. Einax J.W., 2012. Occurrence and fate of organophosphorus flame retardants and plasticizers in coastal and marine surface waters. *Water research* 46, 532
- [10] Liu J. Li J. Zhao Y. Wang Y. Zhang L. Wu Y., 2010. The occurrence of perfluorinated alkyl compounds in human milk from different regions of China. *Environment International* 36, 433
- [11] Frequently Asked Questions (EFRA). Brussels (January 2007)
- [12] van der Veen I. De Boer J., 2012. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis, *Chemosphere* 88 1121,1124
- [13] CEFIC, 2007. European Flame Retardants Association (EFRA). What are FRs? Flame Retardant Market Statistics. www.cefic-efra.com
- [14] Schmitt E., 2007 Phosphorus-based flame retardants for thermoplastics. *Plastics, Additives and Compounding* 9, 26-30
- [15] Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Conference of the Parties to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants UNEP/POPS/COP.5/INF/27 Fifth meeting Geneva, 25–29 April 2011
- [16] Recomendación Europea 2014/118/UE
- [17] Roosens L. D'Hollander L. Bervoets L. Reynders H. Van Campenhout K. Cornelis C. Van Den Heuvel R. Koppen G. Covaci A., 2010. Brominated flame retardants and perfluorinated chemicals, two groups of persistent contaminants in Belgian human blood and milk. *Environmental Pollution* 158, 2546
- [18] Betts K., 2008. New flame retardants detected in indoor and outdoor environments. *Environmental Science & Technology*. 42, 6778

- [19] D'Hollander W. Roosens L. Covaci A. Cornelis C. Reynders H. Van Campenhout K. de Voogt P. Bervoets L., 2010. Brominated flame retardants and perfluorinated compounds in indoor dust from homes and offices in Flanders, Belgium. *Chemosphere* 81, 478-487
- [20] Vonderheide AP. Mueller KE. Meijac J. Welsh GL., 2008. Polybrominated diphenyl ethers: causes for concern and knowledge gaps regarding environmental distribution, fate and toxicity. *Science of the Total Environment* 400, 425-666
- [21] Chemical safety Information from Intergovernmental Organizations <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics1677.htm>
- [22] Organization for Economic Cooperation and Development, OECD Screening Information Dataset, Initial Report for SIAM4, Trimetyls phosphate, UNEP Publications, Tokyo, Japan, 1996
- [23] World Health Organization, Environmental Health Criteria 111, Triphenyl phosphate, World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1991
- [24] Shoeib M. Harner T. Vlahos P., 2006. Perfluorinated chemicals in the Arctic atmosphere. *Environmental Science & Technology* 40, 7577-7583
- [25] Boulanger B. Vargo J. Schnoor JL. Hornbuckle KC., 2005. Detection of perfluorooctane surfactants in Great Lakes water. *Environmental Science & Technology* 38, 4064-4070
- [26] Jahnke A. Berger U. Ebinghaus R. Temme C., 2007. Development and application of a simplified sampling method for volatile polyfluorinated alkyl substances in indoor and environmental air. *Environmental Science & Technology* 41, 3055-3061.
- [27] van Leeuwen SPJ. de Boer J., 2007. Extraction and clean-up strategies for the analysis of poly- and perfluoroalkyl substances in environmental and human matrices. *Journal of Chromatography A* 1153, 172-185
- [28] Martin JW. Muir DCG. Moody CA. Ellis DA. Kwan WC. Solomon KR. Mabury SA., 2004. Collection of airborne fluorinated organics and analysis by gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 74, 584-590.
- [29] Björklund J. Isetun S. Nilsson U., 2004. Selective determination of organophosphate flame retardants and plasticizers in indoor air by gas chromatography, positive-ion chemical ionization and collision-induced dissociation mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18, 3079-3083.
- [30] Tollbäck J. Tamburro D. Crescenzi C. Carlsson H., 2006. Air sampling with Empore solid phase extraction membranes and online single-channel desorption/liquid chromatography/mass spectrometry analysis: Determination of volatile and semi-volatile organophosphate esters. *Journal of Chromatography A* 1129, 1-8
- [31] Tollbäck J. Crescenzi C. Dyremark E., 2006. Determination of the flame retardant tetrabromobisphenol A in air samples by liquid chromatography - mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1104, 106-12
- [32] Saito I. Onuki A. Seto H., 2007. Indoor organophosphate and polybrominated flame retardants in Tokyo. *Indoor Air* 17, 28-36
- [33] Bester K., 2005. Comparison of TCPP concentrations in sludge and wastewater in a typical German sewage treatment plant-comparison of sewage sludge from 20 plants. *Journal of Environmental Monitoring* 7, 509
- [34] Ingerowski G. Friedle A. Thumulla J., 2001. Chlorinated ethyl and isopropyl phosphoric acid triesters in the indoor environment - An inter-laboratory exposure study. *Indoor Air* 11, 145
- [35] Carlsson H. Nilsson U. Becker G. Östman C., 1997. Organophosphate ester flame retardants and plasticizers in the indoor environment: Analytical methodology and occurrence *Environmental Science & Technology* 31, 2931-2936.

- [36] Marklund A. Andersson B. Haglund P., 2005. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in air from various indoor environments. *Environmental & Science Technology* 39, 7423
- [37] Quintana JB. Rodil R. López-Mahía L. Muniategui-Lorenzo S. Prada-Rodríguez D., 2007. Optimisation of a selective method for the determination of organophosphorous triesters in outdoor particulate samples by pressurised liquid extraction and large-volume injection gas chromatography-positive chemical ionisation-tandem mass spectrometry. *Analytical & Bioanalytical Chemistry* 388, 1283
- [38] García M. Rodríguez I. Cela R., 2007 Development of a dispersive liquid-liquid microextraction method for organophosphorus flame retardants and plasticizers determination in water samples. *Journal of Chromatography A* 1152, 280
- [39] García M. Rodríguez I. Cela R., 2007. Optimisation of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of organophosphate compounds in dust samples. *Analytical Chimica Acte* 590, 17-25
- [40] Ericsson M. Colmsjö A., 2003. Dynamic microwavw-assisted extraction coupled on-line with solid phase extraction and large volume injection gas chromatography: determination of organophosphate esters in air samples. *Analytical Chemistry* 75, 1713–1719.
- [41] Kawagoshi Y. Fukunaga I. Itoh H. Mater J., 1999. Distribution of organophosphoric acid triesters between water and sediment at a sea-based solidwaste disposal site. *Cycles Waste Manage* 1, 53
- [42] Remberger M. Sternbeck J. Palm A. Kaj L. Strömberg K. Brorström-Lundén E., 2004. The environmental occurrence of hexabromocyclododecane in Sweden. *Chemosphere* 54, 9–21.
- [43] Xie Z. Ebinghaus R. Lohmann R. Heemken O. Caba A. Puttmann, W., 2007. Trace determination of the flame retardant tetrabromobisphenol A in the atmosphere by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 584, 333-342
- [44] Qi H. Li WL. Liu LY. Song WW. Ma WL. Li YF., 2014. Brominated flame retardants in the urban atmosphere of Northeast China: Concentrations, temperature dependence and gas-particle partitioning. *Science of the Total Environment*. Article in press
- [45] Beser MS. Pardo O. Beltrán J. Yusà V., 2011. Design of experiment approach for the optimization of polybrominated diphenyl ethers determination in fine airborne particulate matter by microwave-assisted extraction ang gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 4847-4855
- [46] Kadar H. Veyrand B. Barbarossa A. Pagliuca G. Legrand A. Boshier C. Boquien CY. Durand S. Monteau F. Antignac JP. Le Bizec B., 2011. Development of an analytical strategy based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for mesuring perfluorinated compounds in humen breast milk: Application to the generation of preliminary data regarding perinatall exposure in France. *Chemosphere* 85, 473-480
- [47] Llorca M. Farré M. Picó Y. Lopez-Teijón M. Álvarez JG. Barceló D., 2010. Infant exposure of perfluorinated compounds: Levels in breast milk and commercial baby food. *Environment International* 36, 584-592
- [48] Hlousková V. Lanková D. Kalachová K. Hrádková P., 2014. Brominated flame retardants and perfluoroalkyl substances in sediments from the Czech aquatic ecosystem. *Science of the Total Enviaronment* 470-471, 407-416
- [49] Lanková D. Lacina O. Pulkrabova J. Hajslova J., 2013. The determination of perfluoroalkyl substances, brominated flam retardants and their metabolites in human breast milk and infant formula. *Talanta* 117, 318-325
- [50] Wang X. Liu J. Yin Y., 2011. Development of an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for high throughput determination of

- organophosphorus flame retardants in environmental water. *Journal of Chromatography A* 1218, 6705
- [51] Gomez-Perez ML. Plaza-Bolaños P. Romero-Gonzalez R. Martinez-Vidal JL. Garrido-Frenich A., 2012. Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry *Journal of Chromatography A* 1248, 130– 138
- [52] Kaufmann A. Walter S., 2013. Post-run target screening strategy for ultra high performance liquid chromatography coupled to Orbitrap based veterinary drug residue analysis in animal urine. *Journal of Chromatography A* 1292, 104– 110
- [53] Hernandez F. Sancho JV. Ibáñez M. Abad E. Portolés T. Mattioli L., 2012. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 1251
- [54] Kaufmann A., 2012. The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 1233.
- [55] Ojanperä S. Pelander A. Pelzing M. Krebs I. Vuori E. Ojanperä I., 2006. Isotopic pattern and accurate mass determination in urine drug screening by liquid chromatography/time of flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 20, 1161-1167
- [56] Perry RH. Cooks RG. Noll RJ. Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation, ion motion and applications. Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) Department of Chemistry, Purdue University, West Lafayette, 2008
- [57] Makarov A. Scigelova M., 2010. Coupling liquid chromatography to Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217, 3938-3945
- [58] Orbitrap Exactive™ Operations. Training Course Manual. ThermoFisher Scientific
- [59] SANCO 12571/2013

Anexo I

C:\XCALIBUR\140611_MIX_PFCs1_REP1_04

PFCs1 NEG_1

MIX PFCs1_1

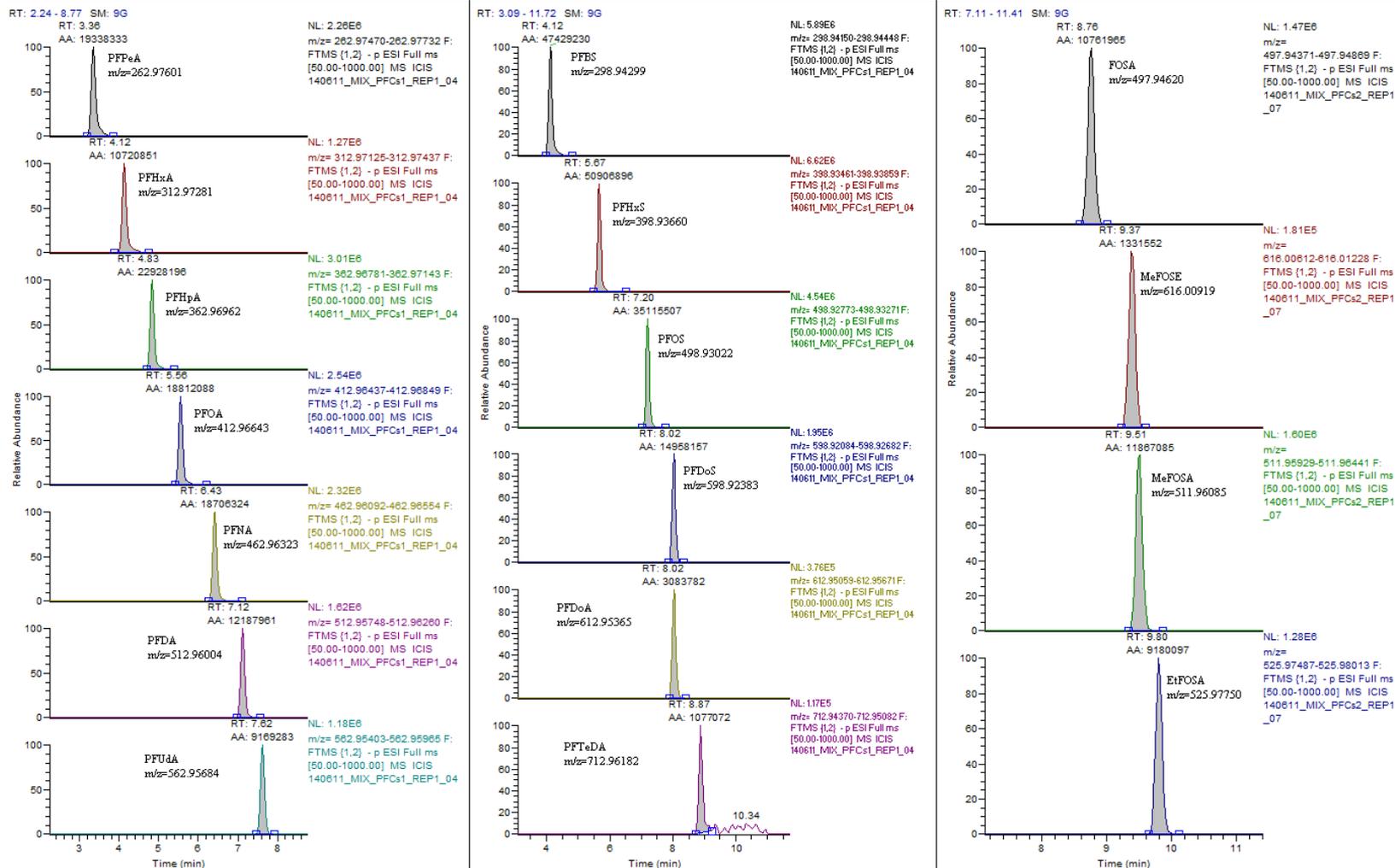


Fig. 1A: Cromatogramas (XIC) obtenidos en los PFCs

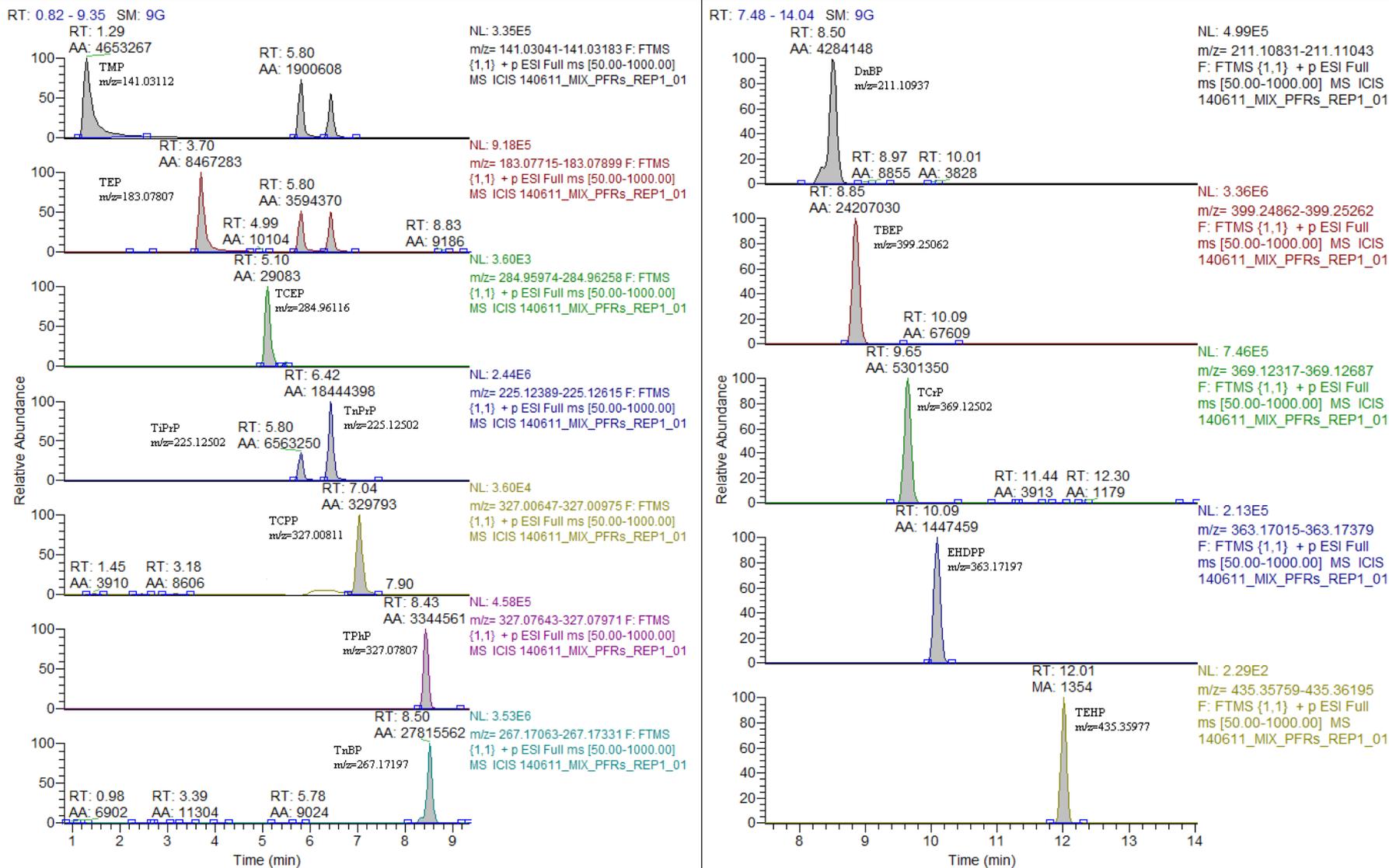


Fig. 2A: Cromatogramas (XIC) obtenidos en los PFRs