

FOTOIONIZACIÓN A PRESIÓN ATMOSFÉRICA PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS HALOGENADOS MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Encarnación Moyano¹, Juan Francisco Ayala-Cabrera², Francisco Javier Santos¹

¹ Grupo ChoMS-EnviFood, Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica, Universidad de Barcelona

² Grupo de Investigación IBeA, Departamento de Química Analítica, Universidad del País Vasco

Introducción

El desarrollo económico y tecnológico de las sociedades ha llevado a un aumento de las actividades industriales y agrícolas, intensificando la contaminación antropogénica y afectando gravemente la calidad de los distintos compartimentos de nuestro ecosistema (aire, agua y suelo). Entre los contaminantes orgánicos que son liberados al medio ambiente, hay una gran preocupación por los compuestos halogenados, ya que la mayoría de ellos son disruptores endocrinos y pueden causar efectos adversos en organismos vivos. Estos contaminantes orgánicos halogenados pueden acumularse en los tejidos grasos (bioacumulación), son altamente resistentes a la degradación y muchos de ellos presentan una gran movilidad en el medio ambiente, siendo susceptibles de ser transportados a largas distancias [1]. Estas razones han llevado a considerar como contaminantes orgánicos persistentes (POPs, *Persistent Organic Pollutants*) a algunas de estas familias de compuestos. La mayoría de estos POPs halogenados son pesticidas (p. ej., clordano, lindano y toxafeno) o productos químicos industriales, como los bifenilos policlorados (PCB), los naftalenos policlorados (PCN) y el ácido perfluorooctano sulfónico (PFOS), mientras que otros son subproductos, no intencionados de procesos industriales, como las dibenzo-*p*-dioxinas policloradas y los dibenzofuranos policlorados (PCDD/Fs), entre otros. Muchos de los POPs halogenados suelen analizarse mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), utilizando generalmente técnicas de ionización de alto vacío, como la ionización electrónica (EI) o la ionización química (CI). Algunos de estos POPs halogenados presentan problemas con estas técnicas de ionización, como la alta fragmentación que produce la EI o la baja eficacia de ionización que suele darse en CI. Estos inconvenientes pueden comprometer seriamente la selectividad y la sensibilidad de algunas determinaciones [2,3]. En las últimas décadas, en el acoplamiento GC-MS se ha popularizado el uso de las fuentes a presión atmosférica (API, *Atmospheric Pressure Ionization*) en combinación con analizadores de masas de alta resolución, como el Orbitrap o el de tiempo de vuelo (TOF) [4,5]. La ionización química a presión atmosférica (APCI, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) y la fotoionización a presión atmosférica (APPI, *Atmospheric Pressure Photoionization*) han resultado ser una buena alternativa para solventar los problemas observados

con las fuentes de ionización tradicionales (EI, CI) en GC-MS. Estas fuentes API (GC-APCI, GC-APPI) producen una ionización suave que permite preservar las moléculas originales generando los iones moleculares $[M]^{+}$ o los iones producto resultado de la protonación $[M+H]^{+}$ o desprotonación $[M-H]^{-}$ de los analitos. La transferencia de energía a las moléculas durante la etapa de ionización es muy baja en las técnicas API y ello impide una alta fragmentación en la fuente de ionización, aunque para los compuestos más lábiles, en algunos casos, la energía transferida pueda ser suficiente para provocar una mínima fragmentación. Esta ionización suave genera espectros de masas con un menor número de iones por compuesto, lo que simplifica el proceso de interpretación, especialmente cuando se trabaja con muestras de elevada complejidad. Además, estas fuentes API pueden ionizar una gama más amplia de familias de compuestos que pueden presentar un abanico mucho más amplio de polaridades, lo que abre nuevos campos de aplicación en las determinaciones por GC-MS [6–8]. Así se ha observado que las interfaces GC-APCI y GC-APPI son capaces de ionizar de manera muy eficaz algunos contaminantes halogenados, como PCDD/Fs, PCBs o difeniléteres polibromados (PBDEs), consiguiendo una alta sensibilidad y precisión en la determinación de estas familias de contaminantes [9–12]. Por otro lado, la posibilidad de utilizar las interfaces GC-API con analizadores de masas de alta resolución (HRMS), como el TOF o el Orbitrap, ofrecen importantes ventajas con respecto a los instrumentos tradicionales de sector magnético, ya que pueden trabajar en un modo de adquisición de barrido completo mucho más sensible y rápido. Además, las fuentes API ofrecen la posibilidad de alternar los acoplamientos de sistemas de cromatografía de gases y de líquidos con un mismo espectrómetro de masas, lo que permite mejorar el rendimiento y el coste de este tipo de instrumentación. La interfaz GC-APPI se ha utilizado, hasta el momento, mucho menos que la de GC-APCI, y por ello su funcionamiento, aplicabilidad y ventajas son mucho menos conocidas. En este trabajo se pretende dar una breve descripción de los fundamentos de APPI para GC-MS y mostrar algunas de las aplicaciones que hemos desarrollado en nuestro grupo de investigación utilizando GC-APPI-HRMS para el análisis de compuestos halogenados en muestras medioambientales.

Mecanismo de ionización en GC-APPI

La primera fuente de GC-APPI fue desarrollada por Revelsky et al. en 2003 [5] y posteriormente se han desarrollado diferentes prototipos que han ido mostrando las altas capacidades que esta técnica de ionización puede ofrecer en el campo de GC-MS [13,14]. En GC-APPI, la fotoionización suele llevarse a cabo con lámparas UV de vacío, siendo las más comunes las de Kriptón. Estas lámparas liberan fotones con una energía de 10,0 - 10,6 eV, la cual suele ser superior al potencial de ionización de la mayoría de los compuestos orgánicos, pero inferior a la del gas portador (He) y/o a la del gas auxiliar (N₂) que generalmente suelen utilizarse. Este hecho permite reducir de manera significativa el ruido de fondo, mejorando la sensibilidad de los métodos [6].

Una de las principales diferencias entre los prototipos de las fuentes GC-APPI estriba en la posición relativa de la lámpara UV con respecto a la entrada del eluyente cromatográfico y la salida hacia el espectrómetro de masas, ya que este parámetro afecta tanto a la estabilidad de la señal como a la eficacia de la ionización. Uno de los diseños que ha dado mejores resultados es el desarrollado por Kersten et al. [14] y Kauppila et al. [13]. En este diseño, la salida de la columna capilar de GC y la entrada del gas auxiliar (N₂) generan un vórtice, cuyo vértice corresponde a la salida hacia el espectrómetro (Figura 1).

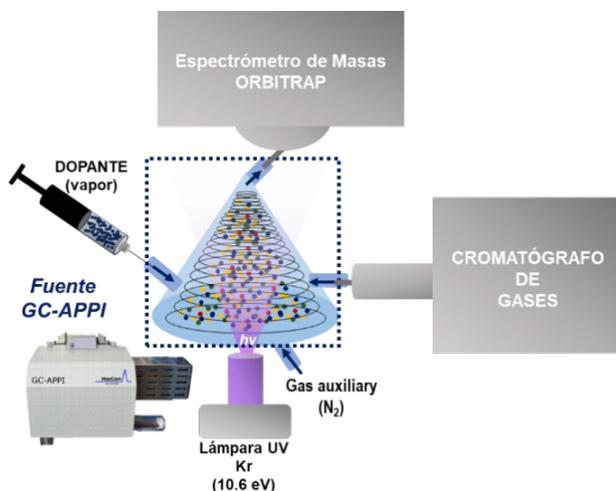


Figura 1. Fuente GC-APPI basada en el diseño de vórtice y desarrollada por MasCom Technologies.

En este diseño, la lámpara UV se sitúa por debajo de la entrada de los gases, permitiendo la fotoionización en el interior de este volumen cónico. Este flujo de gases hacia el vértice del vórtice permite preservar la eficacia cromatográfica a la vez que posibilita un tiempo de residencia de los compuestos en esta fuente suficiente para lograr una alta eficacia de ionización. La región de la lámpara UV está aislada herméticamente del entorno circundante, lo que hace posible llevar a cabo una fotoionización muy estable, con mínimo ruido de fondo y baja formación de iones aductos, tanto en el caso de

fotoionización directa como mediante la utilización de dopantes. Esta idea de configuración de la fuente GC-APPI se desarrolló en colaboración con MasCom Technologies que, en 2013, lanzó la primera fuente GC-APPI disponible comercialmente como interfaz para los analizadores de masas tipo Orbitrap.

Son muchas las reacciones que pueden tener lugar en la fase gaseosa durante el proceso de fotoionización. No obstante, hay que tener en cuenta que, a diferencia de la fuente APPI para el acoplamiento LC-MS, en GC-APPI la fase móvil (gas portador: He) es inerte y no participa en el mecanismo/proceso de ionización. En la Figura 2 se muestran los principales mecanismos de ionización que pueden tener lugar para generar iones positivos. Si el analito tiene una energía de ionización (IE) inferior a 10,6 eV, la fotoionización puede tener lugar directamente debido a la interacción del analito en fase gas con los fotones emitidos por la lámpara UV de Kr para generar iones moleculares [M]⁺⁺ (Figura 2a). Posteriormente, puede tener lugar una autoprototonación del analito por interacción del ion molecular con la molécula neutra del analito en fase gas para formar el ion [M+H]⁺ si la afinidad protónica (PA, *Proton affinity*) de la molécula de analito (M) es mayor que la PA del radical [M-H][•] [15]. Por otro lado, es posible introducir en la zona de la fuente de APPI una sustancia que se fotoionice fácilmente y a la cual se denomina dopante (D). Esta sustancia dopante, la cual debe tener un potencial de ionización inferior a la energía de la lámpara, genera cationes radicales en una proporción mucho mayor que el analito, y éstos son los que posteriormente interaccionan con las moléculas de analito y otras especies en fase gas para llevar a cabo su ionización. Las sustancias dopantes comúnmente utilizadas suelen ser disolventes orgánicos, como tolueno, acetona, clorobenceno, tetrahidrofurano o anisol.

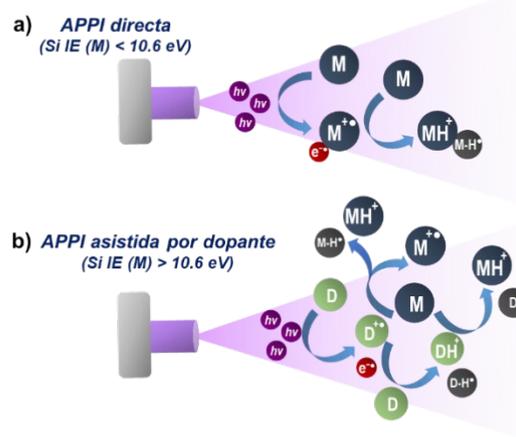


Figura 2. Mecanismo de APPI en modo positivo. (a) Fotoionización directa, (b) fotoionización con mediación de un dopante (donde D es dopante y M es el analito).

La fotoionización asistida por dopantes (Figura 2b) adquiere una mayor relevancia cuando los procesos de fotoionización directa presentan problemas ($IE(M) > 10,6 \text{ eV}$). Sin embargo, hay que indicar que la presencia de algunos de los dopantes podría tener un efecto adverso, pudiendo llegar a suprimir la ionización de algunos analitos, especialmente de aquellos con IE mayores que la del dopante [13]. En una primera etapa de este tipo de fotoionización, la interacción del dopante con los fotones genera el catión radical $[D]^{\bullet+}$, el cual puede continuar interactuando con la molécula del analito neutro a través de procesos de transferencia de carga (si $IE(M) < IE(D)$) o de transferencia protónica (si $PA(M) > PA([D-H]^{\bullet+})$) para producir la ionización de los analitos en fase gas. No obstante, algunas veces también puede producirse un proceso de autoprotonación del propio dopante (si $PA(D) > PA([D-H]^{\bullet+})$), lo que da lugar al dopante protonado $[D+H]^+$, que posteriormente puede ionizar los analitos mediante procesos de transferencia protónica (si $PA(M) > PA(D)$) [15].

En cuanto a los mecanismos de ionización en APPI que llevan a la generación de iones negativos (Figura 3), éstos requieren indiscutiblemente de la mediación de un agente dopante, ya que en su fotoionización se liberan electrones que posteriormente interactúan con las moléculas de analitos que presentan grupos funcionales con afinidad electrónica suficientemente elevada [16]. Por otro lado, el oxígeno presente en la fuente de iones también puede capturar estos electrones para generar el ion superóxido $[O_2]^{\bullet-}$, el cual puede participar más tarde en procesos de intercambio de carga con moléculas neutras en fase gas o dar lugar también a procesos de transferencia protónica que consiguen la desprotonación de las moléculas de los analitos cuando estas presentan una menor afinidad protónica en fase gas. Por ejemplo, la alta afinidad protónica del ion $[O_2]^{\bullet-}$ puede facilitar la desprotonación de los analitos $[M-H]^-$ [16]. Finalmente, también pueden tener lugar procesos de formación de clústeres como en el caso de los compuestos halogenados que tienen tendencia a formar iones fenóxido $[M-X+O]^-$ (donde X: H, Cl o Br) incluso en presencia de niveles traza de oxígeno en una atmósfera de nitrógeno [10].

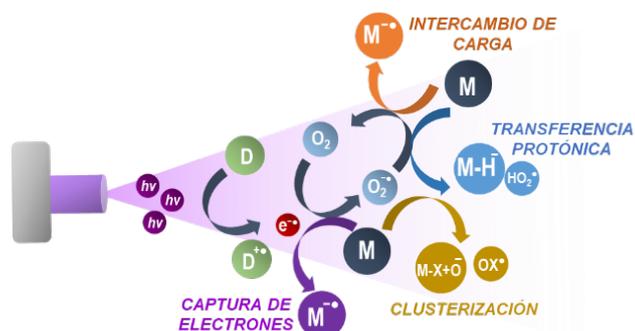


Figura 3. Mecanismo de APPI en modo negativo (donde D es dopante y M es analito).

Aplicaciones GC-APPI-MS

Para mostrar la aplicabilidad de la técnica GC-APPI-HRMS, a continuación, se presentan tres de las aplicaciones desarrolladas por nuestro grupo de investigación [17–20] y que permiten discutir las ventajas e inconvenientes del uso del GC-APPI como alternativa a las técnicas de ionización tradicionales.

El primer ejemplo de aplicación se centra en la detección y determinación de las parafinas cloradas de cadena corta (SCCPs). Esta familia de contaminantes está constituida por mezclas complejas de n-alcenos policlorados de 10 a 13 átomos de carbono y un porcentaje de cloro total variable entre el 30% y el 70% [21]. Su introducción en el medioambiente ha generado una gran preocupación debido a su elevada toxicidad y persistencia, así como a su demostrada capacidad de bioacumulación y biomagnificación [22]. Debido a ello, su uso y producción se ha regulado o prohibido en numerosos países y han sido consideradas como contaminantes orgánicos persistentes por el Convenio de Estocolmo [23]. El análisis de las SCCPs representa un importante reto analítico debido a la complejidad de sus mezclas, formadas por miles de congéneres que imposibilita su completa separación cromatográfica, y a las interferencias espectrales que se producen entre congéneres con diferente longitud de cadena carbonada y/o grado de cloración, que provocan errores significativos en la cuantificación ($>300\%$) [24]. El análisis de las SCCPs se realiza habitualmente por GC-MS utilizando ionización química de iones negativos por captura electrónica (ECNI), debido a que la EI proporciona una elevadísima fragmentación. Aunque la ECNI permite separar los diferentes grupos de homólogos mediante la monitorización de los iones $[M-Cl]^-$ y $[M-HCl]^-$, estos iones están interferidos isobáricamente por la contribución de congéneres de grado de cloración superior que coeluyen cromatográficamente. Además, la respuesta de la fuente ECNI depende del número de átomos de cloro de la molécula, lo que afecta a la cuantificación [24]. Para minimizar todos estos problemas se han utilizado diferentes aproximaciones basadas en la calibración por regresión lineal del factor de respuesta de cada familia de homólogos con el grado de cloración, el uso de la calibración por regresión lineal múltiple, seleccionando iones característicos comunes a todos los grupos de homólogos, o mediante la aplicación de métodos de deconvolución para separar las respuestas de los diferentes grupos de congéneres [17]. No obstante, todas estas estrategias no proporcionan una solución rápida, segura y fiable en la determinación de estos compuestos. El uso de técnicas de ionización blandas, como la fuente GC-APPI, combinadas con la HRMS con tecnología Orbitrap, parecen que pueden facilitar la determinación de esta familia de contaminantes ayudando a solventar algunas de las limitaciones indicadas anteriormente.

La fotoionización de las SCCPs en la fuente GC-APPI requiere el uso de la mediación de un dopante, ya que

estos compuestos no disponen de grupos que permitan absorber la radiación emitida por la lámpara de Kr. De entre los dopantes (en fase vapor) evaluados (tolueno, acetona, clorobenceno, tetrahidrofurano y anisol) la acetona ha mostrado ser el dopante más efectivo. En general, se ha observado que el grado de cloración de los compuestos afecta de manera significativa a los perfiles de los espectros de masas. Por ejemplo, los iones de más elevada abundancia generados por los congéneres con menos de 6 átomos de cloro suelen corresponder a los aductos superóxidos $[M+O_2]^-$ (pico base) y los aductos con cloruro $[M+Cl]^-$, mientras que para los compuestos con 7 átomos de cloro los iones que predominan son el $[M+O_2-Cl]^-$ y el $[M+Cl-HCl]^-$. En cambio, las parafinas con 8 o más átomos de cloro no suelen formar el aducto superóxido, pero generan de manera más abundante los iones fragmento debidos a pérdidas sucesivas de HCl y Cl del ion molecular. Para evitar las interferencias isobáricas entre congéneres que coeluyen es necesario potenciar la formación del ion aducto $[M+Cl]^-$ mediante la adición de algún disolvente clorado al dopante (acetona). En este caso, la mezcla de acetona y CCl_4 en la proporción 3:1 (v/v) permitió alcanzar la máxima respuesta del ion $[M+Cl]^-$. En la Figura 4 se muestra, a modo de ejemplo, los cromatogramas GC-APPI-HRMS correspondientes a la completa separación de los undecanos en función su grado de cloración y el espectro de masas de un congénere del grupo de homólogos hexacloroundecanos.

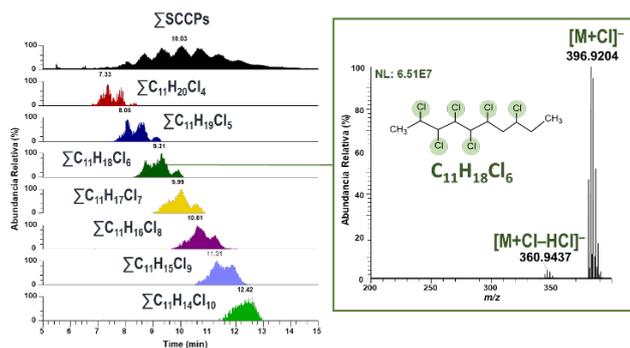


Figura 4. Cromatogramas GC-APPI-HRMS de los congéneres cloroundecanos con diferente grado de cloración y el espectro de masas de un congénere del grupo de homólogos hexacloroundecanos.

Otro de los aspectos importantes que afecta a la cuantificación de las SCCPs es la dependencia de la respuesta con el número de átomos de cloro de la molécula. A diferencia de lo que ocurre con la fuente de ECNI, la fuente GC-APPI proporciona para estos compuestos una respuesta independiente del grado

de cloración y que es proporcional a la concentración. Este hecho permite simplificar de forma importante la cuantificación de las mezclas de SCCPs, siendo posible utilizar el método de la normalización interna para determinar el factor de respuesta de las diferentes familias de homólogos utilizando mezclas de SCCPs con diferente contenido en cloro (51,5%, 55,5% y 63,0%) como patrón de cuantificación independientemente de la mezcla o mezclas responsables de la contaminación. El método GC-APPI-HRMS desarrollado ha dado excelentes resultados, como lo demuestran los parámetros de calidad obtenidos en su validación (linealidad, $r^2 > 0.993$; precisión, $RSD\% < 7\%$; veracidad, $ER\% < 8\%$). Los límites de detección instrumentales alcanzados oscilaron entre 0,07 y 0,19 pg inyectados, dependiendo del grupo de homólogos, mientras que los límites de detección del método en muestras de pescado se encuentran en el intervalo de 17 a 35 pg g⁻¹ (p.f., peso fresco). Este método GC-APPI-HRMS se ha aplicado a la determinación de SCCPs en muestras de salmón y atún, detectándose niveles de concentración que oscilaron entre 25,8 y 28,3 ng g⁻¹ (p.f.), en el caso del salmón, y entre 6,3 y 30 ng g⁻¹ (p.f.) para el atún. Los perfiles de concentración encontrados corresponden a mezclas de SCCPs del 51,5% y 55,5% de cloro total. Los resultados de este estudio demostraron, por primera vez, las ventajas del GC-APPI-HRMS (Orbitrap) en la detección y determinación de SCCPs frente a otros métodos existentes.

Otro de los ejemplos de aplicación del uso del GC-APPI es la determinación de las sustancias per- y polifluoroalquiladas (PFAS) de carácter neutro. Durante años, las PFAS se han estado produciendo ampliamente y se han utilizado en una gran variedad de productos de uso industrial y doméstico debido a su elevada estabilidad química y térmica, así como a su capacidad como repelente frente al agua y el aceite, o incluso suciedad. Entre los PFAS neutros se encuentran los fluorotelómeros olefinas (FTOs) y alcoholes (FTOHs), sulfonamidas de fluorooctano (FOSAs) y los sulfonamidoetanoles (FOSEs). Estos compuestos se biodegradan y oxidan fácilmente en el medioambiente y promueven la formación de PFAS iónicos de elevada peligrosidad, como el perfluorooctano sulfonato (PFOS) y el ácido perfluorooctanoico (PFOA). Hasta el momento, los PFAS de carácter iónico son los compuestos que han recibido una mayor atención, y para los que se han desarrollado multitud de métodos analíticos basados en el uso de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS) y en tándem (LC-MS/MS). En cambio, los PFAS neutros se han venido determinando habitualmente mediante GC-MS, utilizando fuentes de ionización de EI y CI en modo de iones positivos. Aunque estas

técnicas de ionización han demostrado ser útiles para el análisis de los PFAS neutros, los límites de detección instrumentales son relativamente elevados ($\sim\mu\text{g L}^{-1}$), debido a la baja eficacia de ionización. Por este motivo, en nuestro grupo de investigación hemos evaluado la fuente de GC-APPI como una posible alternativa a las técnicas tradicionales de ionización para mejorar la capacidad de detección de los PFAS neutros. En este caso, la fotoionización se lleva a cabo en modo de iones negativo, ya que la presencia en su estructura de átomos de flúor altamente electronegativos favorece los procesos de captura electrónica. Como ya se ha comentado anteriormente, para obtener iones negativos en GC-APPI es necesario la mediación de un dopante y, de los disolventes evaluados (tolueno, acetona, clorobenceno, tetrahidrofurano y anisol), la acetona es la que ha proporcionado los mejores resultados para la mayoría de las familias de PFAS neutros estudiadas. En las condiciones óptimas de operación de la fuente GC-APPI, la mayoría de estos PFAS neutros suelen generar el aducto de superóxido $[\text{M}+\text{O}_2]^{-\bullet}$, debido a la presencia de aire junto con los vapores del dopante en la fuente. Así, los FTOHs suelen generar mayoritariamente el ion aducto del superóxido $[\text{M}+\text{O}_2]^{-\bullet}$. Además, también se observa la formación de iones fragmento debidos a diversas roturas de la cadena fluoroalquílica. En cambio, los FTOs suelen generar un ion superóxido menos estable, que termina fragmentándose (p.ej., $[\text{M}+\text{O}_2-\text{HF}_2\text{O}]^{-}$, $[\text{M}+\text{O}_2-\text{HF}_2]^{-}$ o $[\text{C}_9\text{OF}_{15}]^{-}$), así como fragmentos correspondientes a la cadena fluoroalquílica que termina dando lugar al ion $[\text{M}-\text{CH}_3\text{F}_2]^{-}$ (pico base). En el caso de los FOSEs, se suelen formar el ion $[\text{M}+\text{O}_2]^{-\bullet}$ y los iones fragmento debido a las pérdidas de etanol, $[\text{M}-\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}]^{-}$ (pico base), así como del grupo funcional sulfoamido-etanólico, $[\text{M}-\text{NRC}_2\text{H}_4\text{OH}]^{-}$ (R: CH_3 , C_2H_5). Por último, las FOSAs son los únicos que dan lugar a la formación de iones debido a la desprotonación de las moléculas $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ (pico base), pero también generaron iones fragmento debido a la pérdida del grupo sulfonamida a partir de éstos $[\text{M}-\text{NHCH}_3]^{-}$ (Figura 5a). La presencia de todos estos iones característicos proporciona información estructural muy valiosa que ayuda a confirmar la detección de los PFAS neutros en muestras complejas, así como a identificar otros compuestos relacionados.

El método GC-APPI-HRMS (Orbitrap) proporciona una excelente selectividad y unos límites de detección para la mayoría de los compuestos que se encuentra dentro del intervalo que va de 0,03 a 0,3 ng mL^{-1} , claramente inferiores a los obtenidos hasta ahora utilizando GC-CI-MS y LC-APCI-MS/MS [25-27] y del orden de 50 veces más bajos a los obtenidos con LC-APPI-MS [25]. A modo de ejemplo, la Figura 5(b) muestra la comparación de los límites de detección obtenidos con diferentes métodos de ionización para

los FTOHs. El método GC-APPI-HRMS se ha utilizado para el análisis de PFAS neutros en aguas [19]. Para poder alcanzar los niveles de detección requeridos en muestra, la extracción y preconcentración de los analitos se desarrolló un método de microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS-SPME), utilizando una fibra de divinilbenceno-carboxen-polidimetilsiloxano de 100 μm de espesor. La combinación de la técnica HS-SPME con el método GC-APPI-HRMS ha resultado ser altamente reproducible ($\text{RSD}\% < 11\%$) y veraz ($\text{RE}\% < 12\%$), proporcionando límites de detección de método (0,02 - 15 ng L^{-1}), que son del orden de 40 a 200 veces más bajos que los alcanzados con otros métodos descritos en la bibliografía. Los excelentes resultados obtenidos suponen un importante avance sobre los métodos ya existentes en términos de detectabilidad, sensibilidad y selectividad para la determinación de PFAS neutros en muestras de aguas.

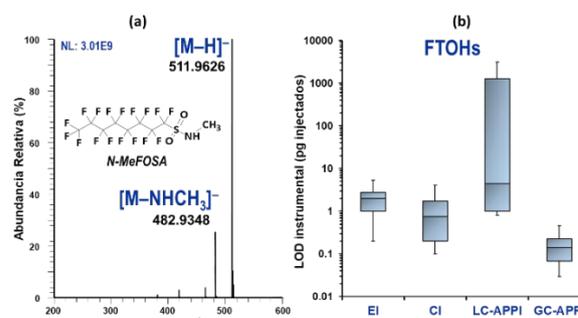


Figura 5. (a) Espectro de masas GC-APPI-HRMS de la n-metilperfluoro-1-octanosulfonamida (N-MeFOSA) y (b) límites de detección (LODs) de los fluorotelómeros alcoholes (FTOHs) obtenidos con diferentes técnicas de ionización.

El tercer y último ejemplo de aplicación del GC-APPI se centra en la determinación de dibenzo-*p*-dioxinas y dibenzofuranos policlorados (PCDD/Fs) y los bifenilos policlorados similares a las dioxinas, *dioxin-like PCBs* (dl-PCBs). Estos compuestos constituyen tres de las familias de contaminantes de mayor preocupación debido a su elevada toxicidad, capacidad de bioacumulación y persistencia en el medioambiente [28]. Los PCDD/Fs se originan como subproductos de la combustión o síntesis de otras sustancias cloradas, mientras que los PCBs son compuestos que se han utilizado extensamente debido a su gran estabilidad térmica y alta capacidad para el aislamiento eléctrico. Pese a que las estrictas regulaciones que se han venido aplicando hasta ahora han permitido disminuir los niveles de concentración medioambientales, su seguimiento global a gran escala continúa siendo necesario para proteger la salud de los seres vivos [18] [29]. En general, los métodos analíticos desarrollados para la determinación de PCDD/Fs se basan principalmente

en el uso de GC-HRMS utilizando analizadores de doble enfoque (sectores EB) e EI, metodología que ha sido considerada durante muchos años de referencia. No obstante, la ionización EI produce una significativa fragmentación, incluso utilizando bajas energías (~ 32 eV), lo que reduce la capacidad de detección de estos compuestos a muy bajas concentraciones. Las mejoras conseguidas en los últimos años en términos de capacidad de detección, sensibilidad y precisión utilizando analizadores de alta resolución como el Orbitrap o el TOF, han hecho que los métodos analíticos basados en estas tecnologías alternativas se hayan ido aceptando como métodos confirmatorios. Sin embargo, el uso de nuevas técnicas de ionización suave, como APPI, pese a haber demostrado su eficacia para la detección de otras familias de contaminantes, no han sido aún evaluadas. Por esta razón, en nuestro grupo de investigación hemos desarrollado y validado un nuevo método GC-APPI-HRMS (Orbitrap) para la determinación de PCDD/Fs y dl-PCBs en muestras medioambientales y alimentarias y que pretende ser una alternativa al método de referencia GC-EI-HRMS (doble enfoque) actualmente aceptado [18]. El nuevo método pretende mejorar la detectabilidad de estos compuestos, maximizando la intensidad de los iones del clúster molecular y minimizando la posible fragmentación en la fuente. Para ello, se evaluaron diferentes dopantes (acetona, benceno, clorobenceno, dietiléter, tetrahidrofurano y tolueno) para mejorar la respuesta trabajando en los modos de adquisición tanto de iones positivos como de iones negativos. En las condiciones óptimas de trabajo de la fuente GC-APPI, todos los compuestos en estudio mostraron un comportamiento similar frente a los diferentes dopantes que se evaluaron. Todos los espectros de masas en modo de iones positivos presentan un ion molecular $[M]^{+•}$ muy intenso (pico base) y la ausencia de iones fragmento, aunque la abundancia del ion molecular parece depender de la naturaleza del dopante y del modo de ionización. Así, el benceno es el disolvente que proporciona la máxima respuesta en modo de iones positivos, mientras que en modo de iones negativos tanto el benceno como el dietiléter son los dopantes que dan mejores resultados. En el modo de iones negativos, todos los espectros de masas de ambas familias de compuestos muestran la formación del ion fenóxido $[M-Cl+O]^{-}$, aunque para las PCDDs se observan algunas diferencias en función del grado de cloración. Por ejemplo, las dioxinas tetracloradas presentan el ion $[M-Cl+O_2]^{-}$ como pico base del espectro, mientras que las dioxinas pentacloradas y hexacloradas generan el ion $[M-Cl+O]^{-}$. En cambio, el pico base para las dioxinas heptacloradas y la octaclorodioxina suele ser el ion $[M-Cl]^{-}$. La formación más abundante, y en algunos casos, casi exclusiva, del ion fenóxido en algunos de estos compuestos (PCDFs y dl-PCBs)

puede estar relacionada con un menor impedimento estérico. Respecto a los límites de detección instrumentales, con el método GC-APPI-HRMS los valores más bajos se alcanzan al utilizar benceno como dopante en modo de iones negativos (0,5 - 25 fg en columna), en especial para el 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina, que es el compuesto que presenta la mayor toxicidad. En cambio, en modo de iones positivos y con benceno (dopante), tan sólo es posible detectar las PCDD/Fs a niveles de 25 - 125 fg (inyectados en columna). En el caso de las dl-PCBs, el dietiléter es el dopante que, en modo de iones negativos, da los mejores resultados. Los métodos GC-APPI-HRMS (Orbitrap) desarrollados para la determinación de PCDD/Fs y dl-PCBs se han evaluado de acuerdo con los requisitos y criterios establecidos en el actual reglamento de la Unión Europea para el análisis de muestras ambientales y alimentarias (*EU Regulation 2017/664-771*). Los resultados obtenidos en esta evaluación satisfacen plenamente los estándares de calidad requeridos. Además, estos métodos GC-APPI-HRMS (Orbitrap) se han sometido a una validación completa analizando diversos materiales de referencia certificados (cenizas volantes, BCR-615; lodos de depuradora, BCR-677), así como materiales utilizados en ejercicios de intercomparación (harina de soja, aceite y sedimento) y para el control interno de laboratorio (pollo enriquecido). Los resultados se han comparado con los obtenidos con el método de referencia GC-EI-HRMS acreditado y la concentración de referencia, concluyendo que no existían diferencias significativas entre los resultados (Figura 6).

Los resultados de este estudio demuestran la gran eficacia de la fuente GC-APPI frente a la EI y las elevadas prestaciones de la técnica GC-APPI-HRMS (Orbitrap) para la determinación sensible y selectiva de estas familias de contaminantes.

Conclusiones

Los estudios realizados hasta el momento por nuestro grupo de investigación para evaluar la aplicabilidad real de la fuente de GC-APPI como alternativa a las fuentes tradicionales en la determinación mediante GC-MS de diversas familias de contaminantes han demostrado ser muy satisfactorios. La gran versatilidad y eficacia de la ionización APPI asistida por dopantes combinada con la elevada sensibilidad y selectividad que ofrece la espectrometría de alta resolución con tecnología Orbitrap abre la puerta a nuevas aplicaciones en los campos del control medioambiental y vigilancia alimentaria, así como en la detección de nuevos contaminantes.

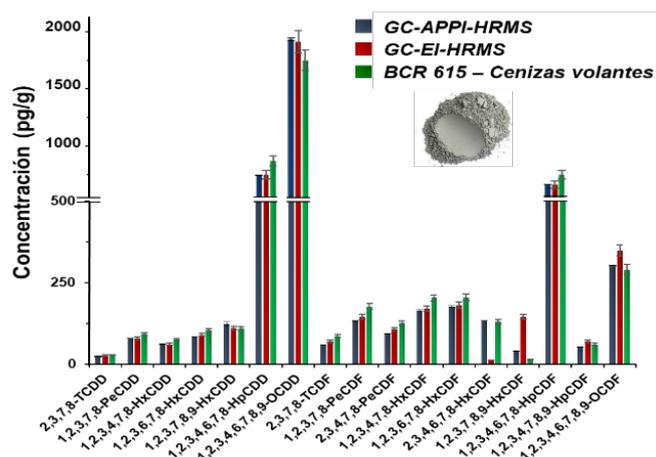


Figura 6. Concentraciones de las PCDD/Fs en el material de referencia certificado BCR-615 (cenizas volantes).

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España el apoyo económico (proyecto PID2021-122743NB-100) y a la Generalitat de Cataluña por el reconocimiento como grupo de investigación consolidado (2021 SGR 00281).

Referencias

[1] W. Xu, X. Wang, Z. Cai, *Anal. Chim. Acta.* 790 (2013) 1–13.
 [2] T. Portolés, J.G.J. Mol, J. V. Sancho, F. Hernández, *Anal. Chem.* 84 (2012) 9802–9810.
 [3] T. Portolés, J.G.J. Mol, J. V. Sancho, F. Hernández, *J. Chromatogr. A.* 1339 (2014) 145–153.
 [4] J.F. Ayala-Cabrera, L. Montero, S.W. Meckelmann, F. Uteschil, O.J. Schmitz *Anal. Chim. Acta.* 1238 (2023) 340353.
 [5] V. Revelsky, I.A., Yashin, Y.S., Sobolevsky, T.G., Revelsky, A.I., Miller, B., Oriedo, *Eur. J. Mass Spectrom.* 507 (2003) 497e507.
 [6] J.F. Ayala-Cabrera, L. Montero, S.W. Meckelmann, F. Uteschil, O.J. Schmitz *Anal. Chim. Acta.* 1238 (2023) 340379.
 [7] M. Raro, T. Portolés, J. V. Sancho, E. Pitarch, F. Hernández, J. Marcos, R. Ventura, C. Gómez, J. Segura, O.J. Pozo, *J. Mass Spectrom.* 49 (2014) 509–521.
 [8] I.A. Revelsky, Y.S. Yashin, *Talanta.* 102 (2012) 110–113.
 [9] R.A. Di Lorenzo, V. V. Lobodin, J. Cochran, T. Kolic, S. Besevic, J.G. Sled, E.J. Reiner, K.J. Jobst, *Anal. Chim. Acta.* 1056 (2019) 70–78.
 [10] L. Luosujävi, M.-M. Karikko, M. Haapala, V. Saarela, S. Huhtala, S. Franssila, R. Kostianen, T. Kotiaho, T.J. Kauppila, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 425–431.
 [11] T. Portolés, C. Sales, M. Abalos, J. Sauló, E. Abad, *Anal. Chim. Acta.* 937 (2016) 96–105.

[12] B. Van Bavel, D. Geng, L. Cherta, J. Nácher-Mestre, T. Portolés, M. Ábalos, J. Sauló, E. Abad, J. Dunstan, R. Jones, A. Kotz, H. Winterhalter, R. Malisch, W. Traag, J. Hagberg, I. Ericson Jogsten, J. Beltran, F. Hernández, *Anal. Chem.* 87 (2015) 9047–9053.
 [13] T.J. Kauppila, H. Kersten, T. Benter, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 25 (2014) 1870–1881.
 [14] H. Kersten, K. Kroll, K. Haberer, K.J. Brockmann, T. Benter, A. Peterson, A. Makarov, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 27 (2016) 607–614.
 [15] T.J. Kauppila, H. Kersten, T. Benter, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 26 (2015) 1036–1045.
 [16] E. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry. Principles and Applications*, 3rd., John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, 2007.
 [17] J.F. Ayala-Cabrera, M.T. Galceran, E. Moyano, F.J. Santos, *Anal. Chim. Acta.* 1172 (2021) 338673.
 [18] J.F. Ayala-Cabrera, M. Ábalos, E. Abad, E. Moyano, F.J. Santos, *Anal. Bioanal. Chem.* 412 (2020) 3703–3716.
 [19] J.F. Ayala-Cabrera, A. Contreras-Llin, E. Moyano, F.J. Santos, *Anal. Chim. Acta.* 1100 (2020) 97–106.
 [20] J.F. Ayala-Cabrera, E. Moyano, F.J. Santos, *J. Chromatogr. A.* 1609 (2020) 460463.
 [21] D.C.G. Muir, G. Stern, G. Tomy, *Chlorinated Paraffins*, in: O. Hutzinger, J. Paasivirta (Eds.), *New Types Persistent Halogenated Compd.*, 1st ed., Springer, Berlin, Heidelberg, 2000: pp. 203–236.
 [22] M. Houde, D.C.G. Muir, G.T. Tomy, D.M. Whittle, C. Teixeira, S. Moore, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 3893–3899.
 [23] United Nation Environment Programme - UNEP: Eighth meeting of the Conference of the Parties., Decision SC-8 / 11: Listing of short-chain chlorinated paraffins, Stockholm, 2017.
 [24] T.P. Rusina, P. Korytár, J. de Boer, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91 (2011) 319–332.
 [25] J.F. Ayala-Cabrera, F. Javier Santos, E. Moyano, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 4913–4924.
 [26] X. Liu, Z. Guo, E.E. Folk, N.F. Roache, *Chemosphere* 129 (2015) 81–86.
 [27] A. Dreyer, C. Temme, R. Sturm, R. Ebinghaus, *J. Chromatogr. A* 1178 (2008) 199–205.
 [28] S. Kanan, F. Samara, *Trends Environ. Anal. Chem.* 17 (2018) 1–13.
 [29] S.P.J. Van Leeuwen, H.A. Leslie, J. De Boer, S.P.J. Van Leeuwen, B. Van Bavel, E. Abad, H. Fiedler, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 46 (2013) 198–206.