



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

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

**ESPECIACIÓN Y FRACCIONAMIENTO  
ISOTÓPICO DE MERCURIO EN MUESTRAS  
BIOLÓGICAS**

**TESIS DOCTORAL**

**LAURA SUÁREZ CRIADO**

Oviedo, 2023





**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**

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

**MERCURY SPECIATION AND ISOTOPIC  
FRACTIONATION IN BIOLOGICAL SAMPLES**

**DOCTORAL THESIS**

**LAURA SUÁREZ CRIADO**

Oviedo, 2023





Universidad de Oviedo

## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Especiación y fraccionamiento isotópico de mercurio en muestras biológicas	Inglés: Mercury speciation and isotopic fractionation in biological samples
2.- Autor	
Nombre: Laura Suárez Criado	DNI/Pasaporte/NIE: .....
Programa de Doctorado: Programa de Doctorado en Análisis Químico, Bioquímico y Estructural y Modelización Computacional	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

### RESUMEN (en español)

El mercurio (Hg) es uno de los metales más tóxicos que se conocen. Su elevada volatilidad hace que su ciclo biogeoquímico sea extremadamente complejo. La forma química en la que el Hg está presente en la naturaleza determina no solo su ciclo biogeoquímico, sino también su toxicidad, absorción, metabolismo y acumulación en los seres vivos. La presente tesis doctoral aborda el estudio de la distribución, metabolismo, detoxificación y fraccionamiento isotópico de especies de mercurio utilizando isótopos estables enriquecidos y espectrometría de masas.

En el primer capítulo, se realiza una comparación entre espectrometría de masas con fuente de acoplamiento inductivo (ICP-MS) acoplada a cromatografía de gases (GC), espectrometría de masas de ionización electrónica acoplada a cromatografía de gases (GC-EI-MS) y espectrometría de masas de ionización electrónica en tándem acoplada a cromatografía de gases (GC-EI-MS/MS) para la determinación de metilmercurio (MeHg), etilmercurio (EtHg) y mercurio inorgánico (Hg(II)) en muestras biológicas por dilución isotópica con trazador triple. Para ello se analizaron diferentes materiales de referencia por medio de las tres técnicas mencionadas (GC-ICP-MS, GC-EI-MS y GC-EI-MS/MS), y se compararon los valores obtenidos. GC-ICP-MS resultó ser la mejor técnica para la determinación de las especies de Hg en muestras con matrices complejas.

En el segundo capítulo, se llevó a cabo la determinación de metilmercurio y mercurio inorgánico en muestras de pelo humano por dilución isotópica con trazador doble y GC-ICP-MS. Se analizaron muestras de cabello de población autóctona de Colombia de zonas afectadas por la minería artesanal de oro. También se determinó la concentración de MeHg y de mercurio total (HgT) en un material de pelo humano proporcionado por el Instituto Nacional de Estudios Ambientales (NIES) de Japón, para su posterior certificación.

En el tercer capítulo, se compararon varios procedimientos de corrección del fenómeno de



Universidad de Oviedo

la discriminación de masas para la medida de la composición isotópica específica de las especies de mercurio por GC-ICP-MS de tipo multicolelector (MC). En varias sesiones de medida se analizó el estándar primario NIST SRM-3133 frente al NIST SRM-3133 y el estándar secundario NIST RM-8610 frente al NIST SRM-3133. A los datos se les aplicaron diversos procedimientos de corrección interna utilizando talio y los modelos de corrección de Russell y Baxter y dos procedimientos de corrección externa (*bracketing* muestra-patrón y modelo de Baxter) para la corrección del fenómeno de la discriminación de masas.

En el cuarto capítulo, se aplica una corrección interna del fenómeno de la discriminación de masas utilizando un doble trazador para la medida de las relaciones isotópicas específicas de las especies de Hg por GC-MC-ICP-MS con un inyector de vaporización a temperatura programada (PTV). Se caracterizó un trazador compuesto por una mezcla 1:1 de  $^{199}\text{Hg(II)}$  y  $^{201}\text{Hg(II)}$ , que sustituye al TI utilizado tradicionalmente para la corrección interna de la discriminación de masas en la medida de la composición isotópica de las especies de Hg. En varias sesiones de medida se analizó el estándar primario NIST SRM-3133 frente al NIST SRM-3133 y el estándar secundario NIST RM-8610 frente al NIST SRM-3133, con diferentes condiciones de inyección (*Hot Splitless*, *Cold Splitless* y PTV) aplicando las dos posibilidades de corrección interna, y se compararon los resultados.

Finalmente, en el quinto capítulo, se evalúa la exactitud y precisión en el análisis de las relaciones isotópicas de HgT por MC-ICP-MS y generación de vapor frío (CVG) con amplificadores de las copas de Faraday de  $10^{13}$  Ohmios. En varias sesiones de medida se analizó un estándar caracterizado previamente frente al NIST SRM-3133, utilizando dos configuraciones de conos diferentes (Estándar y *Jet*), dos condiciones de plasma (seco y húmedo) y tres configuraciones de amplificadores diferentes (combinando los amplificadores tradicionales de  $10^{11}$  Ohmios con los de  $10^{13}$  Ohmios). La mejor combinación para el análisis de muestras con un contenido de Hg menor a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (conos *Jet*, condiciones de plasma seco y cuatro amplificadores de  $10^{13}$  Ohmios) se aplicó en el análisis de muestras de agua reales contaminadas por metales pesados.

#### RESUMEN (en Inglés)

Mercury (Hg) is one of the most toxic metals. Its high volatility makes its biogeochemical cycle extremely complex. The chemical form in which Hg is present in nature not only determines its biogeochemical cycle but also its toxicity, absorption, metabolism, and accumulation in living organisms. This doctoral thesis studies the distribution, metabolism, detoxification, and isotopic fractionation of mercury species using enriched stable isotopes and mass spectrometry.

The first chapter involves a comparison of inductively coupled plasma mass spectrometry



(ICP-MS) coupled to gas chromatography (GC), electron ionization mass spectrometry coupled to gas chromatography (GC-EI-MS), and electron ionization tandem mass spectrometry coupled with gas chromatography (GC-EI-MS/MS) for the determination of methylmercury (MeHg), ethylmercury (EtHg), and inorganic mercury (Hg(II)) in biological samples using triple spike species-specific isotopic dilution. Different biological reference materials were analyzed using the three mentioned techniques (GC-ICP-MS, GC-EI-MS, and GC-EI-MS/MS), and the obtained values were compared. GC-ICP-MS proved to be the best technique for determining mercury species in samples with complex matrix.

In the second chapter, the determination of methylmercury and inorganic mercury in human hair samples was carried out using double-spiking isotope dilution and GC-ICP-MS. Hair samples of indigenous population of Colombia from areas affected by artisanal gold mining were analyzed. Additionally, MeHg and total mercury (THg) were determined in a human hair material provided by the National Institute for Environmental Studies (NIES) in Japan, for subsequent certification.

In the third chapter, various methods for the correction of the mass bias effect in the measurement of mercury species-specific isotopic composition by multicollector (MC) GC-ICP-MS were compared. The primary standard NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133 and the secondary standard NIST RM-8610 was also analyzed vs. NIST SRM-3133 in several measurement sessions. Different internal correction procedures were applied to the data using thallium and Russell and Baxter correction models, as well as two external correction procedures (sample-standard bracketing and Baxter model) to correct for mass bias effect.

In the fourth chapter, an internal correction for the mass bias effect was applied using a double spike for the measurement of Hg species-specific isotope ratios by GC-MC-ICP-MS with a temperature-programmed vaporization (PTV) injector. A tracer composed of a 1:1 mixture of  $^{199}\text{Hg(II)}$  and  $^{201}\text{Hg(II)}$  was characterized, replacing the TI traditionally used for internal correction of mass bias in measuring the isotopic composition of Hg species. In several measurement sessions, the NIST SRM-3133 primary standard was analyzed against the NIST SRM-3133, and the NIST RM-8610 secondary standard was analyzed vs. NIST SRM-3133, using different injection conditions (Hot Splitless, Cold Splitless, and PTV) while applying the two internal correction possibilities, and the results were compared.

Finally, in the fifth chapter, the accuracy and precision in isotopic ratios analysis of THg by MC-ICP-MS and cold vapor generation (CVG) with  $10^{13}$  Ohm Faraday cup amplifiers are evaluated. In several measurement sessions, an In-House (IH) characterized standard was analyzed vs. the NIST SRM-3133, using two different cone configurations (Standard and Jet), two plasma conditions (dry and wet), and three different amplifier configurations (combining the traditional  $10^{11}$  Ohm amplifiers with the  $10^{13}$  Ohm amplifiers). The best combination for the



Universidad de Oviedo

analysis of samples with a Hg content lower than  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  (Jet cones, dry plasma conditions, and four  $10^{13}$  Ohm amplifiers) was applied to the analysis of water samples polluted with heavy metals.

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





# **ÍNDICE DE CONTENIDOS**

---



<b>A. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>A.1. El mercurio .....</b>	<b>3</b>
A.1.1. El ciclo biogeoquímico .....	4
A.1.1.1. El mercurio en la atmósfera .....	4
A.1.1.2. El mercurio en medios acuáticos.....	7
A.1.1.3. El mercurio en medios terrestres.....	10
A.1.2. Las especies de mercurio .....	13
A.1.2.1. Especies de mercurio (I).....	15
A.1.2.2. Especies de mercurio (II).....	16
A.1.2.3. Especies orgánicas de mercurio .....	17
A.1.3. Los isótopos de mercurio.....	18
A.1.4. Tipos de muestra .....	20
A.1.5. Materiales de referencia .....	22
<b>A.2. Determinación de la concentración de las especies de mercurio ..</b>	<b>25</b>
A.2.1. El concepto de la dilución isotópica .....	25
A.2.2. Ecuación de la dilución isotópica .....	27
A.2.3. Análisis por dilución isotópica específica de especies .....	29
A.2.3.1. Trazadores isotópicos sencillos.....	30
A.2.3.2. Trazadores isotópicos múltiples .....	31
<b>A.3. Composición isotópica del mercurio .....</b>	<b>34</b>
A.3.1. Fraccionamiento dependiente de la masa.....	35
A.3.2. Fraccionamiento independiente de la masa .....	36
A.3.2.1. Volumen nuclear .....	37
A.3.2.2. Espín magnético.....	38
A.3.2.3. Fraccionamiento independiente de la masa en los isótopos pares .....	39
A.3.3. Variabilidad isotópica natural de Hg .....	40
<b>A.4. Medida de las relaciones isotópicas de mercurio por espectrometría de masas .....</b>	<b>43</b>
A.4.1. Sistemas de introducción de muestra.....	44
A.4.1.1. Nebulización convencional.....	45
A.4.1.2. Cromatografía de líquidos.....	46
A.4.1.3. Cromatografía de gases .....	47
A.4.1.3.1. Introducción de muestra en el cromatógrafo de gases.....	48

A.4.1.4. Generación de vapor frío .....	50
A.4.2. ICP-MS de tipo cuadrupolo (Q-ICP-MS).....	51
A.4.3. ICP-MS de tipo multicollector (MC-ICP-MS) .....	52
A.4.4. EI-MS/MS.....	54
A.4.5. Factores que afectan a la exactitud de la medida de las relaciones isotópicas.....	56
A.4.5.1. Blancos.....	57
A.4.5.2. Interferencias espectrales.....	57
A.4.5.3. Discriminación de masa.....	57
A.4.5.4. No linealidad del detector .....	59
A.4.6. Factores que afectan a la precisión de la medida de las relaciones isotópicas.....	60
A.4.6.1. Estabilidad del haz de iones.....	60
A.4.6.2. Estadística del conteo de iones.....	60
A.4.6.3. Perfil de los picos isotópicos.....	61
A.4.6.4. Perfil de la señal analítica .....	61
<b>B. OBJETIVOS .....</b>	<b>65</b>
<b>B.1. Objetivos.....</b>	<b>67</b>
B.1.1. Objetivo I .....	67
B.1.2. Objetivo II .....	67
B.1.3. Objetivo III.....	67
B.1.4. Objetivo IV .....	68
B.1.5. Objetivo V.....	68
<b>B.2. Objectives .....</b>	<b>69</b>
B.2.1. Objective I .....	69
B.2.2. Objective II .....	69
B.2.3. Objective III .....	69
B.2.4. Objective IV.....	70
B.2.5. Objective V.....	70
<b>C. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>73</b>
<b>C.1. Instrumentación .....</b>	<b>75</b>
C.1.1. ICP-MS de tipo cuadrupolo.....	75
C.1.2. ICP-MS de tipo multicollector .....	76
C.1.3. Cromatógrafo de gases .....	78

C.1.3.1. Acoplamiento GC-Q-ICP-MS .....	79
C.1.3.2. Acoplamiento GC-MC-ICP-MS .....	80
<b>C.1.4. Unidad de vapor frío .....</b>	<b>81</b>
C.1.4.1. Acoplamiento CVG-MC-ICP-MS .....	82
<b>C.1.5. GC-EI-MS/MS .....</b>	<b>83</b>
<b>C.1.6. Otra instrumentación .....</b>	<b>86</b>
<b>C.2. Materiales y reactivos .....</b>	<b>87</b>
C.2.1. Patrones de abundancia natural y enriquecidos isotópicamente .....	87
C.2.2. Materiales de referencia .....	87
C.2.3. Reactivos generales .....	87
C.2.4. Material de laboratorio .....	88
<b>C.3. Procedimientos experimentales .....</b>	<b>89</b>
C.3.1. Recogida de muestra .....	89
C.3.2. Preparación de muestra para la cuantificación de las especies de mercurio	89
C.3.3. Preparación de muestra para la cuantificación de mercurio total .....	91
C.3.4. Preparación de muestra para la medida de los $\delta^{XXX}\text{Hg}$ .....	91
C.3.4.1 Preparación de muestra para la medida por GC-MC-ICP-MS .....	91
C.3.4.2. Preparación de muestra para la medida por CVG-MC-ICP-MS .....	92
<b>C.3.5. Medida de las relaciones isotópicas de Hg por GC-Q-ICP-MS.....</b>	<b>92</b>
C.3.5.1. Análisis mediante GC-Q-ICP-MS .....	92
C.3.5.2. Caracterización de los trazadores isotópicos enriquecidos ( $^{199}\text{Hg(II)}$ , $^{201}\text{MeHg}$ y $^{199}\text{EtHg}$ ) .....	92
C.3.5.3. Determinación de la concentración de las especies de mercurio por deconvolución de perfiles isotópicos.....	93
C.3.5.4. Corrección de los efectos de la discriminación de masas .....	96
<b>C.3.6. Medida de las relaciones isotópicas de Hg por medio de GC-(EI)-MS/MS</b>	<b>97</b>
C.3.6.1. Análisis mediante GC-EI-MS .....	97
C.3.6.2. Pureza espectral del clúster del ion molecular .....	97
C.3.6.3. Distribuciones isotópicas teóricas de los compuestos naturales y marcados en GC-EI-MS.....	98
C.3.6.4. Análisis mediante GC-EI-MS/MS .....	99

C.3.6.5. Distribuciones isotópicas teóricas de los compuestos naturales y marcados en GC-EI-MS/MS .....	99
<b>C.3.7. Medida de las relaciones isotópicas de Hg por medio de GC-MC-ICP-MS y CVG-MC-ICP-MS.....</b>	<b>100</b>
C.3.7.1. Análisis mediante GC-MC-ICP-MS.....	100
C.3.7.2. Análisis mediante CVG-MC-ICP-MS .....	100
C.3.7.3. Corrección del desfase temporal entre las copas de Faraday	100
C.3.7.4. Cálculo de las relaciones isotópicas .....	101
C.3.7.5. Corrección de la discriminación de masas.....	102
C.3.7.6. Cálculo de los valores $\delta^{xxx}\text{Hg}$ y $\Delta^{xxx}\text{Hg}$ .....	104
<b>D. RESULTADOS.....</b>	<b>107</b>
<b>D.1. CAPÍTULO I.....</b>	<b>109</b>
D.1.1. Introducción .....	111
D.1.2. Objetivos .....	114
D.1.3. Experimental.....	115
D.1.3.1. Instrumentación .....	115
D.1.3.2. Reactivos y materiales.....	116
D.1.3.3. Procedimientos.....	116
D.1.4. Resultados y discusión .....	118
D.1.4.1. Medida de las distribuciones isotópicas por GC-(EI)-MS .....	118
D.1.4.2. Medida de las distribuciones isotópicas por GC-(EI)-MS/MS	122
D.1.4.3. Comparación de los límites de detección y cuantificación .....	126
D.1.4.4. Análisis de los materiales de referencia certificados .....	130
D.1.4.5. Determinación de los factores de interconversión .....	139
D.1.5. Conclusiones .....	142
<b>D.2. CAPÍTULO II.....</b>	<b>145</b>
D.2.1. Introducción .....	147
D.2.2. Objetivos .....	151
D.2.3. Experimental.....	152
D.2.3.1. Instrumentación .....	152
D.2.3.2. Reactivos y materiales.....	153
D.2.3.3. Procedimientos.....	153
D.2.4. Resultados .....	155
D.2.4.1. Control de calidad de las muestras de pelo.....	155

D.2.4.2. Estudio sociodemográfico .....	157
D.2.4.3. Metilmercurio en las muestras de pelo de individuos de Colombia .....	159
D.2.4.4. Mercurio inorgánico en las muestras de pelo de individuos de Colombia.....	162
D.2.4.5. Mercurio total en las muestras de pelo de individuos de Colombia .....	165
D.2.4.6. Metilmercurio en el material de referencia proporcionado por el NIES.....	166
D.2.4.7. Mercurio total en el material de referencia proporcionado por el NIES.....	168
D.2.4.8. Humedad en el material de referencia proporcionado por el NIES .....	170
<b>D.2.5. Discusión de los resultados de las muestras de pelo de Colombia ..</b>	<b>171</b>
D.2.5.1. Consumo de pescado contaminado.....	171
D.2.5.2. Exposición a vapores de Hg.....	174
D.2.5.3. Comparación con otros estudios colombianos .....	175
<b>D.2.6. Conclusiones .....</b>	<b>179</b>
<b>D.3. CAPÍTULO III .....</b>	<b>183</b>
<b>D.3.1. Introducción .....</b>	<b>185</b>
<b>D.3.2. Objetivos .....</b>	<b>188</b>
<b>D.3.3. Experimental.....</b>	<b>189</b>
D.3.3.1. Instrumentación .....	189
D.3.3.2. Materiales y reactivos.....	189
D.3.3.3. Procedimientos.....	190
<b>D.3.4. Resultados y discusión .....</b>	<b>196</b>
D.3.4.1. Evaluación de la variación de la discriminación de masas a lo largo del perfil de elución cromatográfica .....	196
D.3.4.2. Evaluación del procedimiento de corrección da la discriminación de masas en la precisión interna de las medidas de las $R_i$ específicas de Hg(II) por GC-MC-ICP-MS.....	198
D.3.4.3. Evaluación de la precisión y la exactitud de los valores de $\delta$ corregidos por la discriminación de masas .....	203
<b>D.3.5. Conclusiones .....</b>	<b>208</b>
<b>D.4. CAPÍTULO IV .....</b>	<b>211</b>

D.4.1. Introducción .....	213
D.4.2. Objetivos .....	216
D.4.3. Experimental .....	217
D.4.3.1. Instrumentación .....	217
D.4.3.2. Materiales y reactivos.....	217
D.4.3.3. Procedimientos.....	218
D.4.4. Resultados y discusión .....	222
D.4.4.1. Comparación de las condiciones de plasma húmedo y seco .	222
D.4.4.2. Comparación de los modos de inyección del GC .....	224
D.4.4.3. Evaluación de los modos de corrección sin fraccionamiento isotópico en el inyector.....	228
D.4.4.4. Evaluación de los modos de corrección con fraccionamiento isotópico en el inyector.....	230
D.4.5. Conclusiones .....	236
<b>D.5. CAPÍTULO V .....</b>	<b>239</b>
D.5.1. Introducción .....	241
D.5.2. Objetivos .....	244
D.5.3. Experimental .....	245
D.5.3.1. Instrumentación .....	245
D.5.3.2. Materiales y reactivos.....	249
D.5.3.3. Procedimientos.....	249
D.5.4. Resultados y discusión .....	250
D.5.4.1. Evaluación del montaje instrumental.....	250
D.5.4.1.1. Comparación de dos combinaciones de conos diferentes .....	250
D.5.4.1.2. Comparación de las condiciones de plasma húmedo y seco .....	264
D.5.4.1.3. Comparación entre los amplificadores de $10^{11} \Omega$ y $10^{13} \Omega$	267
D.5.4.2. Evaluación de los parámetros de adquisición de datos.....	272
D.5.4.3. Evaluación del nivel de concordancia entre las concentraciones de analitos de la muestra y de la disolución patrón.....	274
D.5.4.4. Evaluación de la precisión externa .....	275

D.5.5. Conclusiones .....	278
<b>E. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>281</b>
<b>E.1. Conclusiones generales.....</b>	<b>283</b>
<b>E.2. Overall conclusions .....</b>	<b>286</b>
<b>F. SUGERENCIAS PARA FUTUROS TRABAJOS .....</b>	<b>289</b>
<b>F.1. Sugerencias para futuros trabajos.....</b>	<b>291</b>
<b>G. ANEXO I.....</b>	<b>295</b>

<b>Figura 1.</b> Ciclo biogeoquímico del Hg en la atmósfera. ....	6
<b>Figura 2.</b> Bioacumulación y biomagnificación del MeHg en el medio acuático. ....	10
<b>Figura 3.</b> Simplificación del ciclo biogeoquímico del Hg en las plantas. ....	13
<b>Figura 4.</b> Principales biomarcadores (pelo, sangre, orina y uñas) usados en la evaluación de la exposición humana a mercurio. ....	22
<b>Figura 5.</b> Experimento clásico de la dilución isotópica con mosquitos rojos y azules. ....	26
<b>Figura 6.</b> Principio de la dilución isotópica para un elemento bi-isotópico (a y b) adaptado de Alonso, J. et al. <sup>54</sup> .....	27
<b>Figura 7.</b> Ejemplo de corrección del fenómeno de interconversión entre el Hg(II) y el MeHg con dilución isotópica por trazador múltiple adaptado de Alonso, J. et al. <sup>54</sup> .....	32
<b>Figura 8.</b> Fraccionamiento independiente de la masa durante el intercambio de Hg(0) entre el aire y el agua adaptado de Lamborg, C. <sup>69</sup> .....	37
<b>Figura 9.</b> Raíz del cuadrado del radio de la carga nuclear ( $r_{nuc}$ ) de los isótopos de mercurio adaptado de Dauphas, N. et al. <sup>67</sup> .....	38
<b>Figura 10.</b> Diagrama $\Delta^{199}\text{Hg}$ (MIF) frente al $\delta^{202}\text{Hg}$ (MDF) para diferentes muestras, tomado de Bergquist, B.A. et al. <sup>71</sup> .....	41
<b>Figura 11.</b> Esquema de los componentes básicos de un espectrómetro de masas adaptado de Dass, C. et al. <sup>79</sup> .....	43
<b>Figura 12.</b> Inyectores de cromatografía de gases. a) Sección transversal de un inyector split/splitless. b) Sección transversal de un inyector de alto volumen (PTV). ....	49
<b>Figura 13.</b> Generador de vapor frío. ....	51
<b>Figura 14.</b> Esquema de un equipo ICP-MS de tipo cuadrupolo. ....	52
<b>Figura 15.</b> Esquema de un equipo MC-ICP-MS acoplado a un cromatógrafo de gases en configuración de plasma húmedo. ....	53
<b>Figura 16.</b> Espectrómetro de masas con fuente de ionización electrónica de triple cuadrupolo acoplado a un cromatógrafo de gases con a) el primer cuadrupolo y	

la celda de colisión apagados (modo SIM) y b) con el primer cuadrupolo y la celda de colisión encendidos (modo MRM). ..... 54

**Figura 17.** Esquema de los principales procesos en espectrometría de masas en tándem adaptado de E.Hoffmann . ..... 56

**Figura 18.** Descripción del efecto de la discriminación de masa en un espectrómetro de masas. .... 58

**Figura 19.** Comparación entre una señal continua (obtenida por CVG) y una señal transiente (obtenida por GC). .... 62

**Figura 20.** Agilent 7900 ICP-MS..... 75

**Figura 21.** Thermo Neptune MC-ICP-MS. .... 76

**Figura 22.** a) Sampler y skimmer estándar. b) Sampler y skimmer Jet. .... 77

**Figura 23.** Cromatógrafo de gases Agilent 7890A (Agilent Technologies, Tokyo, Japón). .... 78

**Figura 24.** Acoplamiento GC-Q-ICP-MS. A) Bloque metálico calentado a 270°C. B) Tubo de PFA introducido en la antorcha..... 80

**Figura 25.** Acoplamiento GC-MC-ICP-MS en condiciones de plasma húmedo. A) Disposición instrumental. B) Conexión entre la cámara de nebulización ciclónica y el tubo de PFA de la salida del GC por medio de una pieza de vidrio en Y. .... 81

**Figura 26.** Unidad de vapor frío y de generación de hidruros HGX-200..... 82

**Figura 27.** Acoplamiento en condiciones de plasma húmedo CVG-MC-ICP-MS. A) Entrada del gas de muestra y del gas adicional al CVG. B) Conexión entre la cámara de nebulización ciclónica con una subunidad de tipo Scott y la unidad CVG. .... 83

**Figura 28.** GC-EI-MS/MS Agilent 7000C. .... 83

**Figura 29.** Sistema microondas Discover (CEM)..... 86

**Figura 30.** Esquema del procedimiento de preparación de muestra para la cuantificación de las especies de mercurio..... 90

**Figura 31.** Balances de masa de las especies Hg(II) y MeHg adaptado de Alonso, J. et al.<sup>54</sup> ..... 93

<b>Figura 32.</b> Esquema de las diferentes estrategias aplicadas para la corrección interna de la discriminación de masas.....	103
<b>Figura 33.</b> Combinación lineal de la composición isotópica de los diferentes constituyentes de una mezcla de abundancia natural de Hg y tres trazadores isotópicos enriquecidos (Me <sup>201</sup> Hg, Et <sup>198</sup> Hg, <sup>199</sup> Hg(II)).....	117
<b>Figura 34.</b> Espectros de masas de una mezcla de patrones naturales propilados de los tres compuestos de mercurio en modo SCAN: a) MeHgPr <sup>+</sup> ; b) EtHgPr <sup>+</sup> ; c) HgPr <sup>2+</sup> .....	119
<b>Figura 35.</b> Optimización de la energía de colisión de 0 a 5 eV. Transición MeHg: 260 →245 m/z; Transición EtHg: 274→245 m/z; Transición Hg(II): 288→245 m/z. ....	123
<b>Figura 36.</b> Resultados obtenidos en el análisis de los materiales de referencia certificados A) IAEA 085 (pelo humano), B) IAEA 086 (pelo humano), C) DOLT-4 (hígado de pez perro) y D) NIST SRM 955 c Nivel 4 (sangre de cabra) por GC-ICP-MS, GC-(EI)-MS (Modo SIM) y GC-(EI)-MS/MS (Modo SRM). Las concentraciones de MeHg, EtHg, Hg(II) y Hg total (HgT) se expresan en µg Hg g <sup>-1</sup> excepto para NIST SRM 955c (ng Hg g <sup>-1</sup> ). Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de n=3 réplicas independientes. ....	132
<b>Figura 37.</b> Cromatogramas GC-ICP-MS de una réplica representativa de los materiales de referencia certificados A) IAEA 085 (pelo humano), B) IAEA 086 (pelo humano), C) DOLT-4 (hígado de pez perro), D) NIST SRM 955 c Nivel 4 (sangre de cabra).....	134
<b>Figura 38.</b> Cromatogramas GC-(EI)-MS (modo SIM) de una réplica representativa de los materiales de referencia certificados A) IAEA 085 (pelo humano), B) IAEA 086 (pelo humano), C) DOLT-4 (hígado de pez perro), D) NIST SRM 955 c Nivel 4 (sangre de cabra).....	136
<b>Figura 39.</b> Cromatogramas GC-(EI)-MS/MS (modo SRM) de una réplica representativa de los materiales de referencia certificados A) IAEA 085 (pelo	

humano), B) IAEA 086 (pelo humano), C) DOLT-4 (hígado de pez perro), D) NIST SRM 955 c Nivel 4 (sangre de cabra). ..... 138

**Figura 40.** Comparación de los factores de desmetilación F1 (%) obtenidos por El utilizando el modo SIM (puntos azules) y SRM (puntos naranjas) con los obtenidos por ICP. .... 142

**Figura 41.** Proceso de “quema” de una amalgama de Hg y oro. .... 148

**Figura 42.** Factores de metilación F1 (%) y desmetilación F2 (%) obtenidos en el análisis de n=96 muestras de pelo humano y para el material de referencia certificado IAEA-086. Los percentiles 25, 50 y 75 están representados por recuadros y los valores máximo y mínimo por bigotes. Los círculos representan los valores atípicos y los asteriscos los extremos. .... 157

**Figura 43.** Concentraciones de MeHg, Hg(II) y HgT (MeHg + Hg(II)) ( $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) obtenidas en las muestras de cabello de los diferentes departamentos colombianos. La línea punteada representa el límite de la OMS de  $2,2 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ , y la línea continua es el límite de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (APA) de  $1,0 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ . .... 159

**Figura 44.** Proporción MeHg/HgT (%) en el pelo de los individuos colombianos en relación con tareas relacionadas con Hg incluyendo Vaupés (A), sin incluir Vaupés (B). .... 162

**Figura 45.** Concentración de Hg(II) ( $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) en el pelo de los individuos colombianos en relación con las tareas que involucran Hg. Considerando Vaupés (A), y no considerando Vaupés (B). .... 164

**Figura 46.** Proporción Hg(II)/HgT (%) en el pelo de los individuos colombianos en relación con tareas relacionadas con Hg incluyendo Vaupés (A), sin incluir Vaupés (B). .... 165

**Figura 47.** Concentración de MeHg ( $\log \text{MeHg}, \mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) en el pelo de las muestras colombianas para cada grupo de consumo de pescado (veces/semana). .... 172

**Figura 48.** Porcentaje de especies de Hg en relación con el HgT ( $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ ). Los puntos verdes representan el % de MeHg y los puntos azules el % de Hg(II). 173

**Figura 49.** Porcentaje de MeHg en relación con el HgT clasificado por género. .... 174

**Figura 50.** Mapa de las regiones colombianas estudiadas: cinco departamentos andinos (Nariño, Chocó, Antioquia, Bolívar y Sucre) y uno amazónico (Vaupés). .... 176

**Figura 51.** Resumen de los diferentes procedimientos de cálculo para las R<sub>i</sub> de Hg (corrección interna) y los valores  $\delta$  específicos de las especies de Hg. .... 194

**Figura 52.** Cálculo de los valores  $\delta$ . a) SSB y b) Modelo propuesto por Baxter et al.<sup>114</sup> ..... 195

**Figura 53.** Distorsión de los residuales de TI durante la elución de Hg(II). Los puntos azules corresponden a los valores de los residuales de TI, mientras que el perfil del pico de <sup>202</sup>Hg se representa en rojo..... 197

**Figura 54.** R<sub>i</sub> <sup>202</sup>Hg/<sup>198</sup>Hg para el NIST RM-8610 (n=8) obtenida en dos sesiones de medida: a) Sesión 1 y b) Sesión 2. Las incertidumbres para cada valor de la R<sub>i</sub> se corresponden con 2SE obtenidas en el cálculo de la relación isotópica. Los valores no corregidos están referidos al eje secundario. .... 199

**Figura 55.**  $\delta^{\text{xxx}}$  Hg(II) (‰) y precisión externa expresada como  $\pm 2\text{SD}$  calculada con SSB y Baxter para seis sesiones de medida independientes. a) Valores  $\delta$ -cero de NIST SRM-3133 frente a NIST SRM-3133 (N=26). La línea gris representa el intervalo de precisión ideal de 0,50‰ basado en otros estudios<sup>105,196</sup>, b) patrón secundario NIST RM-8610 frente a NIST SRM-3133 (N=24). Las líneas grises representan los valores certificados ( $\pm 2\text{SD}$ ) para NIST RM-8610..... 204

**Figura 56.** Diagrama de la técnica del DS, adaptado de Rudge *et al.*<sup>209</sup> ..... 220

**Figura 57.** Cromatogramas obtenidos inyectando 2  $\mu\text{L}$  del estándar NIST SRM-3133 en el cromatógrafo de gases mediante el modo de inyección Hot Splitless a 125°C. (A) Condiciones de plasma húmedo (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  NIST SRM-3133). (B) Condiciones de plasma seco (400  $\mu\text{g L}^{-1}$  NIST SRM-3133 + DS)..... 224

**Figura 58.** Cromatogramas obtenidos inyectando el estándar NIST RM-8610 (UM Almadén) en el cromatógrafo de gases mediante los diferentes modos de inyección en condiciones de plasma húmedo. (A) Hot Splitless a 125°C (2 µL de una disolución de 1000 µg L<sup>-1</sup> de NIST RM-8610). (B) Hot Splitless a 250°C (3 µL de una disolución de 1000 µg L<sup>-1</sup> de NIST RM-8610). (C) Cold Splitless (2 µL de una disolución de 1000 µg L<sup>-1</sup> de NIST RM-8610). (D) PTV (20 µL de una disolución de 100 µg L<sup>-1</sup> de NIST RM-8610)..... 226

**Figura 59.** % de Hg(0) formado a partir del Hg(II) en n=20 inyecciones de entre 2-3 µL en el modo Hot Splitless a 250°C. Los percentiles 25, 50 y 75 están representados por recuadros y los valores máximo y mínimo por bigotes. .... 227

**Figura 60.** Relación de áreas <sup>202</sup>Hg/<sup>205</sup>Tl frente al volumen inyectado del estándar NIST SRM-3133 en el modo PTV. (A) 600 µg L<sup>-1</sup> y (B) 60 µg L<sup>-1</sup> ..... 228

**Figura 61.** Suma cuadrática de los residuales de la diferencia m<sub>i</sub>-n<sub>i</sub> para cada iteración aplicando las leyes exponencial y de Russell al método del DS..... 229

**Figura 62.** Valores δ específicos del Hg(II) (n=10) corregidos por TI + SSB y DS + SSB de cuatro sesiones de medida diferentes utilizando el inyector en el modo Hot Splitless a 125°C. (A) Dos sesiones de medida NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133. La línea roja punteada representa el valor δ-cero estándar. (B) Dos sesiones de medida NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133. Las barras de error representan 2SD de n=10 medidas. Las líneas verdes representan ±2SD de los valores certificados del NIST RM-8610..... 230

**Figura 63.** Valores δ específicos del Hg(II) (n=10) corregidos por TI + SSB y DS + SSB de ocho sesiones de medida diferentes utilizando el inyector en los modos Hot Splitless a 250°C y PTV. (A) Dos sesiones de medida NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133. (Hot Splitless a 250°C) (B) Dos sesiones de medida NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133. (Hot Splitless a 250°C). (C) Dos sesiones de medida NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133. (PTV) (D) Dos sesiones de medida NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133. Las líneas verdes representan ±2SD de los valores certificados del NIST RM-8610. (PTV). La línea roja punteada representa el valor δ-cero

estándar. Las líneas verdes representan  $\pm 2SD$  de los valores certificados del NIST RM-8610. Las barras de error representan 2SD de n=10 medidas. .... 233

**Figura 64.** Representación esquemática del montaje instrumental CVG-MC-ICP-MS en condiciones de plasma húmedo. .... 246

**Figura 65.** Valores medios de  $\delta^{xxx}Hg$  (‰) para el estándar IH (n=5) obtenidos a diferentes niveles de concentración con conos estándar y *jet* en condiciones de plasma húmedo y utilizando amplificadores de  $10^{11} \Omega$ . Las líneas discontinuas rojas representan la media  $\pm 2SD$  de los valores de IH obtenidos previamente<sup>95</sup>. Las barras de error corresponden al 2SD y se obtuvieron a partir de n=5 medidas CVG-MC-ICP-MS..... 252

**Figura 66.** Valores promedio  $\delta^{xxx}Hg$  (‰) para la disolución IH (n=5) obtenidos a diferentes niveles de concentración bajo condiciones de plasma húmedo y seco, utilizando amplificadores de  $10^{11} \Omega$  y conos Jet. Las líneas punteadas rojas representan el promedio  $\pm 2SD$  de los valores IH obtenidos previamente<sup>95</sup>. Las barras de error corresponden a 2SD y se obtuvieron a partir de n=5 medidas de CVG-MC-ICP-MS..... 266

**Figura 67.** Valores promedio de  $\delta^{xxx}Hg$  (‰) para la disolución IH (n=5) obtenidos a diferentes niveles de concentración en condiciones de plasma seco, con los conos jet y utilizando tres configuraciones de amplificadores diferentes: (i)  $10^{11} \Omega$  para cada copa de Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  para las copas de Faraday L2 (<sup>199</sup>Hg), L1 (<sup>200</sup>Hg), H1 (<sup>202</sup>Hg) y  $10^{13} \Omega$  para las copas de Faraday L3 (<sup>198</sup>Hg) y C (<sup>201</sup>Hg), y (iii)  $10^{11} \Omega$  para las copas de Faraday L1 (<sup>200</sup>Hg) y  $10^{13} \Omega$  para las copas de Faraday L3 (<sup>198</sup>Hg), L2 (<sup>199</sup>Hg), C (<sup>201</sup>Hg) y H1 (<sup>202</sup>Hg). Las líneas rojas discontinuas representan el promedio  $\pm 2SD$  de los valores IH obtenidos previamente<sup>95</sup>. Las barras de error corresponden a 2SD y se obtuvieron a partir de n=5 medidas CVG-MC-ICP-MS. .... 269

**Figura 68.** Valores medios de los  $\delta^{xxx}Hg$  (‰) del patrón IH (n=5) obtenidos a diferentes grados de coincidencia de concentración de Hg entre la disolución patrón IH y la disolución patrón NIST SRM-3133 a un nivel de concentración de

aproximadamente  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$  Hg. Las líneas rojas discontinuas representan la media  $\pm$  2SD de los valores de IH obtenidos previamente<sup>95</sup>. Las barras de error corresponden a 2SD y se obtuvieron a partir de n=5 medidas CVG-MC-ICP-MS.  
..... 275

<b>Tabla 1.</b> Propiedades físicas y químicas del mercurio elemental.....	15
<b>Tabla 2.</b> Propiedades de los isótopos naturales de mercurio.....	19
<b>Tabla 3.</b> Algunos materiales de referencia disponibles para la especiación de mercurio.....	24
<b>Tabla 4.</b> Valores delta de Hg del NIST RM 8610 calculados frente al NIST SRM 3133.....	42
<b>Tabla 5.</b> Parámetros experimentales del Q-ICP-MS empleados.....	76
<b>Tabla 6.</b> Parámetros experimentales del MC-ICP-MS empleados.....	78
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de la separación cromatográfica y de inyección.....	79
<b>Tabla 8.</b> Parámetros experimentales GC-EI-MS y GC-EI-MS/MS.....	85
<b>Tabla 9.</b> Condiciones de digestión para el microondas Discover (CEM).....	86
<b>Tabla 10.</b> Pureza espectral de los clústeres de los iones moleculares para las tres especies de mercurio propiladas. Las contribuciones (%) de M y M-1 a los espectros experimentales se calcularon mediante regresión lineal múltiple como se ha descrito anteriormente. Las incertidumbres corresponden con las desviaciones estándar de n=5 inyecciones en GC-(EI)-MS de un patrón de abundancia natural.....	120
<b>Tabla 11.</b> Distribuciones isotópicas teóricas de los clústeres moleculares para los compuestos de mercurio de abundancia natural y marcados propilados, calculadas mediante el algoritmo propuesto por Kubinyi. <sup>111</sup> En la tabla se recogen también las distribuciones isotópicas experimentales obtenidas por GC-ICP-MS para el mercurio.....	122
<b>Tabla 12.</b> Comparación de las distribuciones isotópicas teóricas calculadas siguiendo las indicaciones de Ramaley et al. <sup>113</sup> con las distribuciones experimentales obtenidas por GC-(EI)-MS/MS. La incertidumbre de los resultados corresponde a n=5 inyecciones GC-(EI)-MS/MS independientes de un patrón de abundancia natural de los tres compuestos.....	125

---

<b>Tabla 13.</b> Distribuciones isotópicas teóricas para compuestos propilados de mercurio naturales y marcados de mercurio calculadas según lo descrito por Ramaley et al. <sup>113</sup> .....	126
<b>Tabla 14.</b> Valores de los blancos, límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) expresados como ng Hg g <sup>-1</sup> , obtenidos para Hg(II), MeHg y EtHg a partir de la determinación de n=6 blancos independientes considerando una cantidad de muestra teórica de 0,5g mediante las diferentes técnicas. ....	129
<b>Tabla 15.</b> Resultados obtenidos en análisis de los materiales de referencia certificados NIST SRM 955c, IAEA-085, IAEA-086 y DOLT-4 por GC-ICP-MS, GC-(EI)-MS (Modo SIM) y GC-(EI)-MS/MS (Modo SRM). Las concentraciones de MeHg, EtHg, Hg(II) y Hg total (HgT) se expresan en µg Hg g <sup>-1</sup> excepto para el NIST SRM 955c (ng Hg g <sup>-1</sup> ). La incertidumbre de los valores corresponde a la desviación estándar de n=3 réplicas independientes. ....	131
<b>Tabla 16.</b> Rango de los factores de interconversión (%) obtenidos en el análisis de los materiales de referencia certificados NIST SRM 955c, IAEA-085, IAEA-086 y DOLT-4 mediante GC-ICP-MS, GC-EI-MS (Modo SIM) y GC-EI-MS/MS (Modo SRM). Los factores F3 a F6 relativos al EtHg son solo relevantes para el material NIST SRM 955c.....	141
<b>Tabla 17.</b> Comparación de los valores certificados y experimentales obtenidos en el análisis del material de referencia certificado IAEA-086 (cabello humano) para MeHg, Hg(II) y HgT (ng g <sup>-1</sup> ). La incertidumbre de los valores experimentales corresponde a la desviación estándar obtenida en el análisis de n=12 réplicas independientes.....	155
<b>Tabla 18.</b> Blancos, L.D. y L.C. calculados para Hg(II), MeHg y HgT (ng Hg g <sup>-1</sup> ) a partir de la determinación de n=6 blancos de procedimiento independientes considerando una cantidad de muestra teórica de 0,1 g. ....	156
<b>Tabla 19.</b> Variables descriptivas de los individuos colombianos (n = 96) distribuidos por departamentos. ....	158

<b>Tabla 20.</b> Media, máximo, mínimo, mediana y rango intercuartílico (percentil 25 - 75) de los valores experimentales obtenidos para MeHg, Hg(II) y HgT (MeHg + Hg(II)) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en las muestras de pelo distribuidas por departamentos.....	161
<b>Tabla 21.</b> Valores de MeHg obtenidos en dos sesiones de medida para tres alícuotas independientes de dos botellas del material de referencia proporcionado por el NIES, tres alícuotas del material IAEA-086, un blanco instrumental y un blanco de procedimiento ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ).....	167
<b>Tabla 22.</b> Diferentes condiciones de extracción del HgT para el material de referencia de pelo humano IAEA-086.....	168
<b>Tabla 23.</b> Valores de HgT obtenidos en dos sesiones de medida para tres alícuotas independientes de dos botellas del material de referencia proporcionado por el NIES, tres alícuotas del material IAEA-086, un blanco instrumental y un blanco de procedimiento ( $\text{mg Kg}^{-1}$ ).....	169
<b>Tabla 24.</b> Contenido húmedo del material proporcionado por el NIES calculado para tres alícuotas de cada una de las botellas en dos días.....	170
<b>Tabla 25.</b> Resumen de la concentración de HgT y MeHg ( $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) obtenidas en varios estudios de diferentes regiones colombianas. <sup>a</sup> Media $\pm$ DE; <sup>b</sup> Mediana (rango) (continúa).....	177
<b>Tabla 26.</b> Resumen de la concentración de HgT y MeHg ( $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) obtenidas en varios estudios de diferentes regiones colombianas. <sup>a</sup> Media $\pm$ DE; <sup>b</sup> Mediana (rango).....	178
<b>Tabla 27.</b> Valores medios de las $R_i$ del NIST RM-8610 y de precisión interna expresados como $\pm 2\text{SE}$ calculados con Russell y Baxter para tres sesiones de medida independientes con tres modelos diferentes de corrección de la discriminación de masas: 1) 321 puntos de adquisición de TI, 2) 27 puntos de adquisición de TI y 3) Pbp.....	200
<b>Tabla 28.</b> Relaciones isotópicas $^{200}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$ y precisión interna expresada como $\pm 2\text{SE}$ obtenidas con las correcciones de Russell y Baxter para el NIST RM-8610 de tres sesiones de medida ( $n=24$ ) con tres modelos diferentes de corrección de la	

discriminación de masas: 1) LRS con 321 puntos de adquisición de TI, 2) LRS con 27 puntos de adquisición de TI y 3) PbP con 321 puntos de adquisición de TI. 202

**Tabla 29.** Valores  $\delta$ -cero (‰) NIST SRM-3133 medios y precisiones externas expresadas como  $\pm 2SD$  calculadas con SSB y Baxter para tres sesiones de medida independientes con tres métodos de cálculo de corrección de la discriminación de masas diferentes: 1) LRS para 321 puntos de adquisición de TI, 2) LRS para 27 puntos de adquisición de TI y 3) PbP..... 205

**Tabla 30.** Valores  $\delta^{200}Hg$  (‰) NIST RM-8610 medios y precisiones externas expresadas como  $\pm 2SD$  calculadas con SSB y Baxter para tres sesiones de medida independientes con tres métodos de cálculo de corrección de la discriminación de masas diferentes: 1) LRS para 321 puntos de adquisición de TI, 2) LRS para 27 puntos de adquisición de TI y 3) PbP..... 207

**Tabla 31.** Composición isotópica de la disolución del doble trazador..... 220

**Tabla 32.** Valores de RSD% de las relaciones isotópicas calculadas frente al isótopo  $^{201}Hg$  para diferentes mezclas entre el estándar NIST SRM-3133 y el doble trazador..... 223

**Tabla 33.** Valores  $\delta$  específicos del Hg(II) (n=10) de ocho sesiones de medida independientes con fraccionamiento isotópico en el inyector, aplicando dos correcciones de discriminación de masas internas (TI y DS) y dos posibles bracketing para la corrección externa de la discriminación de masas (PTV-PTV y Cold Splitless-PTV) para el NIST SRM-3133 y el NIST RM-8610..... 235

**Tabla 34.** Principales parámetros instrumentales de adquisición para el análisis isotópico de Hg por MC-ICP-MS..... 248

**Tabla 35.** Valores medios  $\delta^{202}Hg$  (‰) para el IH (n=5) y 2SD obtenidos a diferentes niveles de concentración, dos combinaciones de conos (Estándar y Jet), dos condiciones de plasma (Húmedo y seco) y tres configuraciones de amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}Hg$ ), L1 ( $^{200}Hg$ ), H1 ( $^{202}Hg$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{198}Hg$ ) y C ( $^{201}Hg$ ), y

(iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )). ..... 253

**Tabla 36.** Valores medios  $\delta^{201}\text{Hg}$  (‰) para el IH (n=5) y 2SD obtenidos a diferentes niveles de concentración, dos combinaciones de conos (Estándar y *Jet*), dos condiciones de plasma (Húmedo y seco) y tres configuraciones de amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y (iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )). ..... 254

**Tabla 37.** Valores medios  $\delta^{200}\text{Hg}$  (‰) para el IH (n=5) y 2SD obtenidos a diferentes niveles de concentración, dos combinaciones de conos (Estándar y *Jet*), dos condiciones de plasma (Húmedo y seco) y tres configuraciones de amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y (iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )). ..... 255

**Tabla 38.** Valores medios  $\delta^{199}\text{Hg}$  (‰) para el IH (n=5) y 2SD obtenidos a diferentes niveles de concentración, dos combinaciones de conos (Estándar y *Jet*), dos condiciones de plasma (Húmedo y seco) y tres configuraciones de amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y (iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )). ..... 256

**Tabla 39.** Valores promedio de  $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$  (‰) para el estándar IH (n=5) y desviación estándar obtenidos con los conos estándar y jet en condiciones de plasma húmedo y con los amplificadores de  $10^{11} \Omega$  a diferentes niveles de concentración. i) Conos estándar, plasma húmedo, Ampl.  $10^{11} \Omega$ . ii) Conos jet, plasma húmedo, Ampl.  $10^{11} \Omega$ . ..... 257

**Tabla 40.** Valores promedio de RSD (%) y las SD correspondientes para las relaciones isotópicas de Hg de 6 mediciones de una disolución estándar de NIST SRM-3133 de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  obtenidas bajo varias configuraciones: dos configuraciones de conos (Estándar vs. Jet), dos condiciones de plasma (húmedo vs. seco) y tres configuraciones de amplificadores ((i) amplificador de  $10^{11} \Omega$  para cada copa de Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  para las copas de Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  para las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y (iii)  $10^{11} \Omega$  para las copas de Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  para las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )). ..... 259

**Tabla 41.** Valores medios RSD(%) y SD para las relaciones isotópicas de Hg de seis medidas realizadas a niveles de concentración decrecientes de una disolución SRM-3133 del NIST bajo varias configuraciones: dos configuraciones de cono (estándar y jet), dos condiciones de plasma (húmedo y seco) y tres configuraciones de los amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y (iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas de Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )). ..... 260

**Tabla 42.** Valores medios RSD(%) y SD para las relaciones isotópicas de Hg de seis medidas realizadas a niveles de concentración decrecientes de una disolución SRM-3133 del NIST bajo varias configuraciones: dos configuraciones de cono (estándar y jet), dos condiciones de plasma (húmedo y seco) y tres configuraciones de los amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y (iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas de Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )). ..... 261

**Tabla 43.** Valores medios RSD(%) y SD para las relaciones isotópicas de Hg de seis medidas realizadas a niveles de concentración decrecientes de una disolución SRM-3133 del NIST bajo varias configuraciones: dos configuraciones de cono (estándar y jet), dos condiciones de plasma (húmedo y seco) y tres

configuraciones de los amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas de Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )). ..... 262

**Tabla 44.** Valores medios RSD(%) y SD para las relaciones isotópicas de Hg de seis medidas realizadas a niveles de concentración decrecientes de una disolución SRM-3133 del NIST bajo varias configuraciones: dos configuraciones de cono (estándar y jet), dos condiciones de plasma (húmedo y seco) y tres configuraciones de los amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas de Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )). ..... 263

**Tabla 45.** Valores promedio de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) del estándar IH (n=5) y SD y valores promedio RSD % de las relaciones isotópicas de Hg del NIST SRM 3133 (n=6) y SD obtenidos a varios niveles de concentración, con y sin corrección tau. .... 271

**Tabla 46.** Comparación de los valores promedio de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) del estándar IH (n=5) y los valores promedio de SD y RSD(%) de los resultados de las relaciones isotópicas de Hg del NIST SRM-3133 (n=6) y SD obtenidos a un nivel de concentración de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg con dos conjuntos de parámetros de adquisición de datos diferentes: Método 1 (tiempo de integración de 4,194 s, 5 bloques y 1 ciclo) y Método 2 (tiempo de integración de 2,097 s, 1 bloque y 100 ciclos). ... 273

**Tabla 47.** Valores medios de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) (n=20) y 2SD para el estándar IH a diferentes niveles de concentración de Hg..... 276

**Tabla 48.** Composición isotópica del Hg en muestras reales de agua superficial (concentraciones de Hg de aproximadamente  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ ). ..... 278

<b>AAS</b>	Espectrometría de absorción atómica
<b>AFS</b>	Espectrometría de fluorescencia
<b>ALS</b>	Muestreador automático de líquidos
<b>Amp.</b>	Amplificadores
<b>APA</b>	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
<b>CID</b>	Disociación inducida por colisión
<b>COMAR</b>	Base de datos internacional de materiales de referencia certificados
<b>CVG</b>	Generación de vapor frío
<b>EI-MS</b>	Espectrometría de masas con fuente de ionización electrónica
<b>EtHg</b>	Etilmercurio
<b>EVISA</b>	Instituto Virtual Europeo de Análisis de Especies
<b>FeRB</b>	Bacterias reductoras de hierro
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>Hg</b>	Mercurio
<b>Hg(0)</b>	Mercurio elemental
<b>Hg(II)</b>	Mercurio inorgánico
<b>Hg(P)</b>	Mercurio particulado
<b>HgS</b>	Cinabrio
<b>HgT</b>	Mercurio total
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
<b>IAEA</b>	Organismo Internacional de Energía Atómica
<b>ICP-MS</b>	Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
<b>IDA</b>	Análisis por dilución isotópica
<b>IDMS</b>	Dilución isotópica combinada con espectrometría de masas
<b>IH</b>	Patrón secundario <i>In-House</i>
<b>IPD</b>	Deconvolución de perfiles isotópicos
<b>IQR</b>	Rango intercuartílico
<b>IUPAC</b>	Asociación Internacional de Química Pura y Aplicada

## Índice de contenidos

---

<b>JRC</b>	Centro Común de Investigación
<b>LC</b>	Cromatografía de líquidos
<b>L.C.</b>	Límite de cuantificación
<b>L.D.</b>	Límite de detección
<b>LRS</b>	Método de la pendiente de la regresión lineal
<b>MAPE</b>	Minería artesanal y a pequeña escala de oro
<b>MC-ICP-MS</b>	Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo de tipo multicolector
<b>MDF</b>	Fraccionamiento isotópico dependiente de la masa
<b>Me<sub>2</sub>Hg</b>	Dimetilmercurio
<b>MeHg</b>	Metilmercurio
<b>MIE</b>	Efecto del espín magnético
<b>MIF</b>	Fraccionamiento isotópico independiente de la masa
<b>MRM</b>	Seguimiento de reacciones múltiples
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>MS/MS</b>	Espectrometría de masas en tándem
<b>MSC</b>	Cromatografía multijeringa
<b>NIES</b>	Instituto Nacional de Estudios Ambientales
<b>NIMD</b>	Instituto Nacional de la Enfermedad de Minamata
<b>NIST</b>	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología
<b>NIMS</b>	Instituto Nacional de Ciencia de Materiales
<b>NRC-CNRC</b>	Consejo Nacional de Investigación de Canadá
<b>NVE</b>	Efecto del volumen nuclear
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORS</b>	Celda de colisión de tipo octapolo
<b>PbP</b>	Método punto por punto
<b>ppb</b>	partes por billón
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>ppt</b>	partes por trillón
<b>PTV</b>	Inyector de temperatura programada

<b>Q-ICP-MS</b>	Espectrometría de masas con fuente de acoplamiento inductivo de tipo cuadrupolo
<b>Ri</b>	Relación isotópica
<b>RSD</b>	Desviación estándar relativa promedio
<b>SCAN</b>	Modo escaneo
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SE</b>	Desviación estándar interna
<b>SEM</b>	Multiplicador secundario de electrones
<b>SIM</b>	Modo de control de iones seleccionados
<b>SRB</b>	Bacterias reductoras de sulfato
<b>SRM</b>	Seguimiento de reacciones seleccionadas
<b>SSB</b>	Secuencia patrón-muestra-patrón
<b>TIMS</b>	Espectrometría de masas de ionización térmica
<b>TMAH</b>	Hidróxido de tetrametilamonio



## **A. INTRODUCCIÓN**

---



## A.1. El mercurio

El mercurio (Hg) es uno de los metales que más interés público despierta debido a sus implicaciones toxicológicas negativas para los ecosistemas y para la salud humana. A temperatura ambiente, a diferencia del resto de los metales, se encuentra en estado líquido, lo que, junto con su representativo color plateado, le confiere un cierto carácter místico muy valorado entre alquimistas y antiguas civilizaciones. Este metal viene utilizándose por el hombre desde hace más de 3.500 años y sus usos, hoy en día, abarcan desde la elaboración de aparatos electrónicos hasta la minería del oro.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el mercurio se encuentra entre las diez sustancias químicas más peligrosas para la salud pública<sup>1</sup>, pues son muchas las tragedias asociadas a este elemento, de entre las que cabría destacar la catástrofe de la bahía de Minamata, Japón. Este episodio marcaría un antes y un después en lo que al mercurio se refiere, ya que, aunque desde los años 70 ya existían políticas internacionales para regular las emisiones de mercurio, en octubre del año 2013 se redactaría un tratado internacional firmado por 92 países conocido como el convenio de Minamata sobre mercurio. Actualmente, este pacto cuenta con 138 países firmantes y aboga por reducir la contaminación ambiental por mercurio y prevenir y tratar los casos de intoxicación humana con este metal.<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup> WHO, World Health Organization, 2022. Mercury and health, consultado el 13 de octubre de 2022. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health>.

<sup>2</sup> Minamata Mercury Convention, 2021. The convention, about us, consultado el 13 de octubre de 2022. <https://www.mercuryconvention.org>.

El mercurio se encuentra de manera natural en la superficie terrestre y puede ser liberado a la atmósfera a través de diferentes fuentes, iniciándose así el ciclo biogeoquímico, el cual se ha visto afectado por años de actividad antropológica.<sup>3</sup>

Por desgracia (y por suerte para nosotros), la biogeoquímica del Hg está escasamente estudiada, lo que se ve especialmente dificultado por la volatilidad y la mutabilidad del elemento. En palabras del biogeoquímico William Fitzgerald, estudiar el mercurio es como estar "tras la pista de un cometa plateado cuya trayectoria está llena de sorprendentes giros".<sup>4</sup>

### A.1.1. El ciclo biogeoquímico

Una vez que el mercurio entra en circulación, se distribuye en forma de diferentes compuestos químicos por los distintos compartimentos medioambientales. Estos compuestos sufren transformaciones, tanto físicas como químicas, las cuales son, en su mayoría, reversibles y para las que la atmósfera juega un papel fundamental, pues actúa como depósito de mercurio.<sup>5</sup> Muchas de estas transformaciones tienen también lugar en medios acuáticos y terrestres que, junto con fenómenos de emisión, reemisión, transporte y depósito, dan lugar al denominado ciclo biogeoquímico del mercurio.<sup>3</sup>

#### A.1.1.1. El mercurio en la atmósfera

El mercurio es liberado a la atmósfera generalmente como mercurio elemental (Hg(0)), aunque también puede emitirse como mercurio inorgánico (Hg(II)) o incluso asociado a partículas (Hg(P)) y las fuentes de emisión pueden ser tanto naturales como antropogénicas.<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Selin, N.E., 2009. Global biogeochemical cycling of mercury: A review. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 34, 43–63.

<sup>4</sup> Hammerschmidt, C.R., Fitzgerald, W.F., 2004. Geochemical Controls on the Production and Distribution of Methylmercury in Near-Shore Marine Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1487–1495.

<sup>5</sup> Lyman, S.N., Cheng, I., Gratz, L.E., Weiss-Penzias, P., Zhang, L., 2020. An updated review of atmospheric mercury. *Sci. Total Environ.* 707.

Las emisiones naturales de mercurio, o emisiones primarias, provienen de lo que se conoce como los cinturones mercuriales, áreas situadas en los límites de placas tectónicas donde el mercurio se encuentra presente como cinabrio (HgS). Este mercurio es liberado a la atmósfera por medio de actividad geológica como, por ejemplo, las erupciones volcánicas o los procesos geotérmicos.<sup>6</sup>

Las emisiones antropogénicas comienzan a destacar con la era industrial, momento a partir del cual la liberación de mercurio a la atmósfera aumenta de manera exponencial, de la mano principalmente de la quema de combustibles fósiles, la minería artesanal de oro y la actividad metalúrgica, modificándose por parte del ser humano el ciclo biogeoquímico natural.<sup>7</sup> La emisión antropogénica de mercurio representa, hoy por hoy, sobre un tercio de todo el mercurio liberado a la atmósfera.<sup>8</sup>

El mercurio elemental juega un papel importante en el ciclo biogeoquímico, ya que es extremadamente volátil y presenta tiempos de residencia en la atmósfera de más de medio año.<sup>9</sup> El Hg(0) puede oxidarse a Hg(II), como se observa en la **Figura 1**, el cual es capaz de depositarse fácilmente, siendo mucho más reactivo y soluble. Esta oxidación es una de las piezas clave para entender el ciclo del mercurio en la atmósfera, sin embargo, las rutas exactas son todavía

---

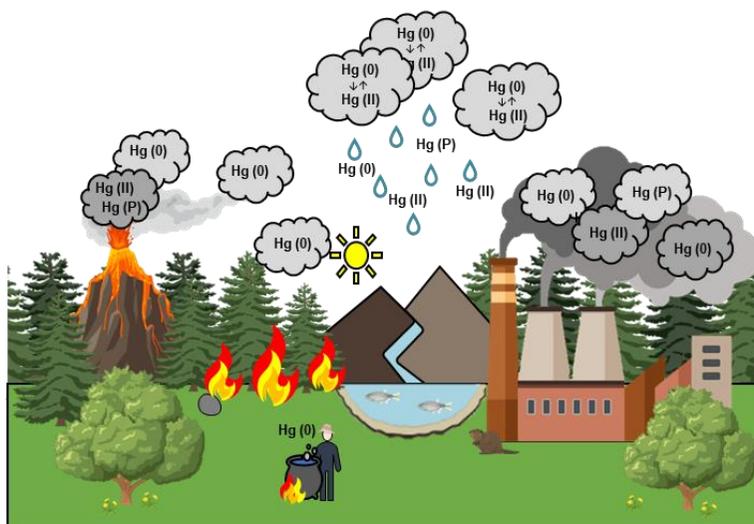
<sup>6</sup> Varekamp, J.C., Buseck, P.R., 1986. Global mercury flux from volcanic and geothermal sources. *Appl. Geochemistry* 1, 65–73.

<sup>7</sup> Obrist, D., Kirk, J.L., Zhang, L., Sunderland, E.M., Jiskra, M., Selin, N.E., 2018. A review of global environmental mercury processes in response to human and natural perturbations: Changes of emissions, climate, and land use. *Ambio* 47, 116–140.

<sup>8</sup> Outridge, P.M., Mason, R.P., Wang, F., Guerrero, S., Heimbürger-Boavida, L.E., 2018. Updated Global and Oceanic Mercury Budgets for the United Nations Global Mercury Assessment 2018. *Environ. Sci. Technol.* 52, 11466–11477.

<sup>9</sup> Lin, C.J., Pehkonen, S.O., 1999. The chemistry of atmospheric mercury: A review. *Atmos. Environ.* 33, 2067–2079.

desconocidas, aunque hay propuestas como la oxidación por  $O_3$ ,  $OH$ ,  $Cl_2$ ,  $H_2O_2$  o  $NO_3$ .<sup>10</sup>



**Figura 1.** Ciclo biogeoquímico del Hg en la atmósfera.

Se asume que la mayor parte del mercurio oxidado en la atmósfera se encuentra como  $Hg(II)$ , ya que los compuestos que forma el  $Hg(I)$  son muy inestables y se oxidan o se reducen muy fácilmente. La reducción de los compuestos de  $Hg(II)$  ocurre principalmente en las plumas de centrales térmicas de carbón o en superficies particuladas de nubes o aerosoles, aunque estos compuestos también pueden sufrir procesos de fotoreducción.<sup>10</sup>

El  $Hg(II)$  semivolátil en fase gas puede adherirse a partículas sólidas, atendiendo a diferentes factores como la temperatura, la composición de las partículas o la existencia de un aerosol acuoso, formando el mercurio particulado. En algunos ambientes, las partículas de mercurio presentan tamaños de más de  $2,5 \mu m$  de diámetro, sin embargo, lo que verdaderamente abunda en la atmósfera

<sup>10</sup> Lyman, S.N., Cheng, I., Gratz, L.E., Weiss-Penzias, P., Zhang, L., 2020. An updated review of atmospheric mercury. *Sci. Total Environ.* 707, 135575.

son partículas de menor tamaño formadas por la adsorción de Hg(II) a productos de combustión.<sup>11</sup>

El mercurio atmosférico, en todas sus formas, puede depositarse local o remotamente de manera húmeda y seca. Con respecto a la era preindustrial, la cantidad de mercurio que se deposita actualmente se ha visto como mínimo triplicada.<sup>3</sup> Ambos tipos de depósito son igualmente importantes, aunque la mayor parte de los estudios se centran en el depósito húmedo, debido al desafío que representan las medidas del depósito seco de Hg. El depósito húmedo se produce en forma de precipitaciones como la lluvia o la nieve o en formas no precipitadas como las nubes, el rocío, la niebla...mientras que el depósito seco está relacionado con superficies subyacentes como las copas de los árboles, los campos agrícolas, desiertos...<sup>10</sup> Tras el depósito, parte del mercurio se revolatilizará para volver a la atmósfera; otra parte, por el contrario, penetrará en sistemas acuáticos y terrestres.<sup>3</sup>

### A.1.1.2. El mercurio en medios acuáticos

El ciclo del Hg en los sistemas acuáticos varía en función de si el medio es marino o de agua dulce.<sup>3</sup> Los océanos son un gran depósito de mercurio y se encuentran íntimamente relacionados con la atmósfera por el intercambio de Hg con el aire.<sup>12</sup> En agua dulce, además del depósito directo de Hg desde la atmósfera, las principales fuentes de mercurio son la liberación directa de vertidos con Hg y la afluencia de ríos con depósitos de Hg acumulados en entornos terrestres.<sup>7</sup> En ambos tipos de sistemas, el mercurio puede encontrarse en

---

<sup>11</sup> Feddersen, D.M., Talbot, R., Mao, H., Sive, B.C., 2012. Size distribution of particulate mercury in marine and coastal atmospheres. *Atmos. Chem. Phys.* 12, 10899–10909.

<sup>12</sup> Soerensen, A.L., Sunderland, E.M., Holmes, C.D., Jacob, D.J., Yantosca, R.M., Skov, H., Christensen, J.H., Strode, S.A., Mason, R.P., 2010. An improved global model for air-sea exchange of mercury: High concentrations over the North Atlantic. *Environ. Sci. Technol.* 44, 8574–8580.

diferentes formas, siendo el metilmercurio (MeHg) la especie de principal preocupación.

El MeHg es un compuesto orgánico con graves implicaciones para la salud debido a sus propiedades toxicocinéticas que le permiten atravesar la barrera celular.<sup>13</sup> La principal vía de exposición humana al MeHg es el consumo de pescado contaminado y aunque la asimilación directa por consumo de agua es de menor importancia, conocer el ciclo de Hg en el agua es crucial para analizar los riesgos ambientales.<sup>3,14,15</sup>

El MeHg se forma por la metilación de parte del Hg(II) presente en el medio acuático, proceso que puede ser tanto biótico como abiótico y que depende de factores como la temperatura, el pH, la salinidad del medio, la cantidad de materia orgánica disponible, etc.<sup>13</sup>

La metilación abiótica ocurre mayormente en medios acuáticos que presentan suficientes donantes de grupos metilo, condiciones disponibles en medios ricos en materia orgánica.<sup>16</sup> Otra posibilidad es que la metilación abiótica sea producto de una fotometilación por radiación ultravioleta (UV), aunque el mecanismo exacto sigue sin estar claro. De todas maneras, la metilación abiótica en sistemas acuáticos es de poca importancia en comparación con la metilación biótica.<sup>17</sup>

---

<sup>13</sup> Ullrich, S.M., Tanton, T.W., Abdrashitova, S.A., 2001. Mercury in the aquatic environment: A review of factors affecting methylation. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 31, 241–293.

<sup>14</sup> Boudou A, Ribeyre F, 1997. Mercury in the food web: accumulation and transfer mechanisms. *Met. Ions. Biol. Syst.* 34, 289–319.

<sup>15</sup> Bodaly RA, St Louis VL, Paterson MJ, Fudge RJ, Hall BD, Rosenberg DM, Rudd JW, 1997. Bioaccumulation of mercury in the aquatic food chain in newly flooded areas. *Met. Ions. Biol. Syst.* 34, 259–87.

<sup>16</sup> Munson, K.M., Lamborg, C.H., Boiteau, R.M., Saito, M.A., 2018. Dynamic mercury methylation and demethylation in oligotrophic marine water. *Biogeosciences* 15, 6451–6460.

<sup>17</sup> Paranjape, A.R., Hall, B.D., 2017. Recent advances in the study of mercury methylation in aquatic systems. *Facets* 2, 85–119.

---

La mayor parte de la producción de MeHg en sistemas acuáticos es llevada a cabo por bacterias. Este proceso de biometilación se observó por primera vez en lagos y aguas costeras de Suecia<sup>18</sup> y se asoció con bacterias reductoras de sulfato (SRB), si bien hoy se sabe que bacterias reductoras de hierro (FeRB) y agentes metanógenos (productores de gas metano) también intervienen en la metilación. Estos organismos son anaerobios facultativos, sin embargo, en zonas profundas del océano deficientes de oxígeno las bacterias aerobias juegan también su papel, por lo que la metilación se podría considerar como una parte de una comunidad de microorganismos que interactúan entre sí.<sup>17</sup> Para que la metilación tenga lugar, los agentes metilantes deben poseer el par génico *hgcAB*, cuyo estudio permite, no solo entender qué organismos son capaces de metilar el mercurio, sino las condiciones que posibilitan que esta metilación ocurra.<sup>19</sup>

La metilación no solo ocurre a nivel de la columna de agua, sino que también tiene lugar en sedimentos.<sup>20</sup> En sistemas de agua dulce, principalmente lagos, la metilación a nivel de sedimento gana valor debido a la proporción entre los volúmenes de agua y tierra.<sup>21</sup> En aguas oceánicas profundas, la especie metilada de mercurio que abunda sobre el MeHg es el dimetilmercurio (Me<sub>2</sub>Hg), el cual se descompone fácilmente a pH bajo.<sup>22</sup>

Los procesos naturales de degradación del MeHg ocurren también mediados por especies microbianas o por procesos abióticos de fotodegradación.<sup>17</sup> La

---

<sup>18</sup> Jensen, S., Jernelöv, A. 1969. Biological Methylation of Mercury in Aquatic Organisms. *Nature* 223, 753–754.

<sup>19</sup> Bravo, A.G., Cosio, C., 2020. Biotic formation of methylmercury: A bio–physico–chemical conundrum. *Limnol. Oceanogr.* 65, 1010–1027.

<sup>20</sup> Fitzgerald, W. F., & Mason, R. P., 1997. Biogeochemical cycling of mercury in the marine environment. *Met. Ions. Biol. Syst.* 34, 53–112.

<sup>21</sup> Munthe, J., Bodaly, R.A., Branfireun, B.A., Driscoll, C.T., Gilmour, C.C., Harris, R., Horvat, M., Lucotte, M., Malm, O., 2007. Recovery of Mercury-Contaminated Fisheries. *AMBIO: A. J. Hum. Environ.* 36, 33–44.

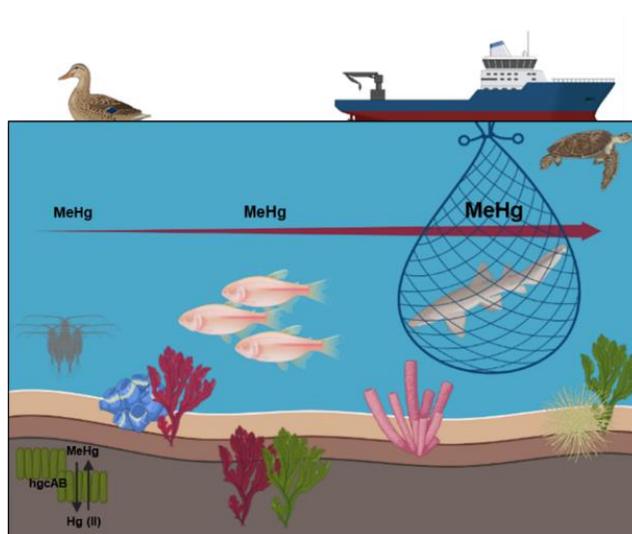
<sup>22</sup> Mason, R.P., Fitzgerald, W.F., 1991. Mercury speciation in open ocean waters. *Water, Air, and Soil Pollut* 56, 779–789.

## Introducción

---

cantidad de MeHg presente en el medio acuático es la resultante del equilibrio entre ambos procesos de metilación y desmetilación.<sup>13</sup>

El metilmercurio de los sistemas acuáticos penetra en la cadena alimentaria ya desde la base, por medio del plancton, dando así lugar al proceso de bioacumulación y consecuentemente a la biomagnificación a lo largo de la cadena trófica<sup>23</sup>, como se puede observar en la **Figura 2**. Esto significa que la concentración de Hg en seres de los niveles tróficos superiores puede aumentar en un factor de hasta  $10^7$  con respecto a los niveles inferiores, atendiendo también a otras características como la edad o el tamaño de los individuos.<sup>13</sup>



**Figura 2.** Bioacumulación y biomagnificación del MeHg en el medio acuático.

### A.1.1.3. El mercurio en medios terrestres

El MeHg compromete la salud humana principalmente a través del consumo de pescado y marisco contaminado y no de alimentos agrícolas o carne, sin

---

<sup>23</sup> Mason, R.P., Reinfelder, J.R. & Morel, F.M.M. 1995. Bioaccumulation of mercury and methylmercury. *Water Air Soil Pollut* 80, 915–921.

embargo, el medio terrestre tiene también un lugar importante en el ciclo global del Hg.<sup>24</sup>

El suelo contiene la mayor reserva de mercurio del medio terrestre, el cual se deposita predominantemente como Hg(II) desde la atmósfera.<sup>3</sup> En función de la asociación con la matriz del terreno se puede encontrar mercurio mineral (contenido en la fracción mineral del suelo), mercurio libre adsorbido a partículas de suelo y mercurio ligado a complejos orgánicos.<sup>25</sup>

Otra gran porción del Hg terrestre reside en la vegetación, ya que puede incorporarse a las plantas tanto de manera directa desde el suelo, por medio de las raíces o mayormente desde la atmósfera, a través de las partes superficiales de la biomasa.<sup>26</sup> Para entender la dinámica del Hg en la vegetación se pueden distinguir entre distintos tipos funcionales de plantas (plantas vasculares, líquenes, musgos), grupos de tejidos (hojas, agujas, raíces, tejidos leñosos), especies o zonas geográficas.<sup>27</sup>

Atendiendo al tipo funcional, en plantas vasculares, el follaje capta el Hg(0) atmosférico principalmente por los estomas y, tras un proceso de oxidación a Hg(II), se acumula y se transloca a tejidos más leñosos. También existe una absorción pasiva de Hg desde la corteza, aunque el transporte hacia el interior de las plantas es escaso. Por otro lado, y como se mencionaba previamente, las raíces de las plantas captan el mercurio directamente del suelo, aunque este queda eficientemente retenido y no se transloca a los tejidos superficiales.<sup>26</sup>

---

<sup>24</sup> Grigal, D.F., 2003. Mercury Sequestration in Forests and Peatlands. *J. Environ. Qual.* 32, 393–405.

<sup>25</sup> Smith-Downey, N. V., Sunderland, E.M., Jacob, D.J., 2010. Anthropogenic impacts on global storage and emissions of mercury from terrestrial soils: Insights from a new global model. *J. Geophys. Res. Biogeosciences* 115, 1–11.

<sup>26</sup> Gworek, B., Dmuchowski, W., Baczevska-Dąbrowska, A.H., 2020. Mercury in the terrestrial environment: a review. *Environ. Sci. Eur.* 32.

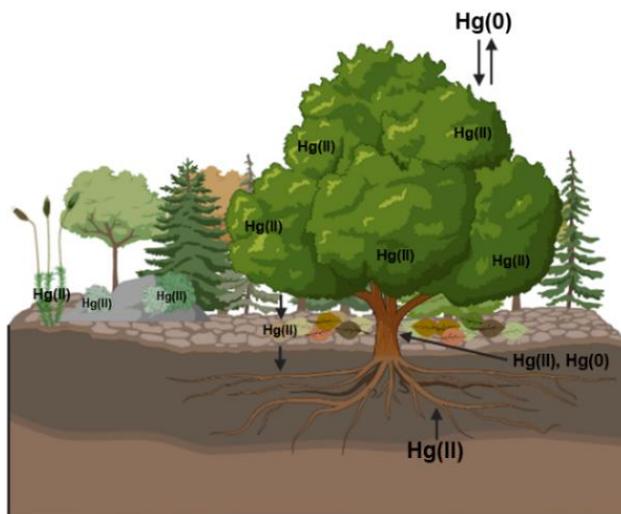
<sup>27</sup> Zhou, J., Obrist, D., Dastoor, A., Jiskra, M., Ryjkov, A., 2021. Vegetation uptake of mercury and impacts on global cycling. *Nat. Rev. Earth Environ.* 2, 269–284.

En comparación con las plantas vasculares, en la vegetación no vascular, que incluye líquenes y musgos, se acumula una mayor concentración de mercurio, bajo el control de varios factores que pueden ser bióticos y abióticos.<sup>26</sup> Al igual que las plantas superiores, una vez que asimilan el Hg(0) de la atmósfera este se oxida a Hg(II) y se inmoviliza durante unas 4 semanas. A pesar de que se ha propuesto a los líquenes y los musgos como bioindicadores pasivos del Hg atmosférico, son muchas las variables medioambientales que complican su uso en actividades de biomonitorización.<sup>28</sup>

El Hg de la vegetación se encuentra estrechamente relacionado con el suelo por procesos como el desprendimiento de las hojas, el lavado de las plantas por precipitaciones o la muerte de las mismas, como denota la **Figura 3**. Además, existe un intercambio dinámico con la atmósfera y procesos de liberación debidos a la quema de materia orgánica. Respecto a la relación entre los ecosistemas terrestres y acuáticos, el Hg adsorbido por la vegetación y depositado posteriormente al suelo se transmite a medios de agua dulce o a aguas costeras, representando una de las mayores fuentes de Hg de los medios acuáticos.<sup>27</sup>

---

<sup>28</sup> Bargagli, R., 2016. Moss and lichen biomonitoring of atmospheric mercury: A review. *Sci. Total Environ.* 572, 216–231.



**Figura 3.** Simplificación del ciclo biogeoquímico del Hg en las plantas.

### A.1.2. Las especies de mercurio

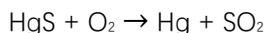
El mercurio se sitúa en la tabla periódica en el grupo 12 o IIb, junto con el zinc y el cadmio, por lo que por su posición fronteriza puede considerarse tanto elemento de transición como elemento representativo. Su configuración electrónica es  $[\text{Xe}]4f^{14}5d^{10}6s^2$ , posee un tamaño algo grande, poca electronegatividad y, aunque es un elemento puramente divalente, su capacidad para formar enlaces Hg-Hg directos permite la existencia de compuestos con estado de oxidación formal +1.<sup>29</sup>

El aislamiento de Hg elemental se realiza de manera directa desde la antigüedad. El cinabrio (HgS), también conocido como bermellón, es la única fuente mineral de mercurio, cuyos depósitos más famosos son los de las minas de Almadén, situadas en la provincia de Ciudad Real (España).<sup>30</sup> El método primitivo utilizado para la extracción de Hg(0) se basaba en la tostación al aire

<sup>29</sup> Carriedo, G. A., 2010. La química inorgánica en reacciones. Síntesis.

<sup>30</sup> Greenwood, N.N., Earnshaw, A., 1984. Chemistry of the elements. Pergamon Press.

sobre maleza de cinabrio, a una temperatura aproximada de 600 °C, para posteriormente recolectar el metal de entre las cenizas:



A temperatura ambiente, el mercurio elemental es un líquido plateado, lo que en latín se conoce como *hydrargyrum*, nombre del que deriva su símbolo, Hg. Bautizado como el mensajero de los dioses romanos, Mercurio, por su movilidad, se trata de un metal notablemente volátil, siendo el único elemento que, junto con los gases nobles, presenta un vapor monoatómico.<sup>31</sup>

El mercurio elemental reacciona muy lentamente con el oxígeno para dar HgO y es necesario calentarlo para que reaccione con S; no reacciona con el agua y puede ser fácilmente atacado por halógenos, dando la forma HgX<sub>2</sub> (donde X representa el Br, Cl, I o F). Tampoco reacciona con NaOH en disolución, ni es atacado por ácidos diluidos, con la excepción del HNO<sub>3</sub>. Por otro lado, puede formar amalgamas con la mayoría de los metales, exceptuando el Fe, Co y Ni.<sup>32</sup> En la **Tabla 1** se puede encontrar una selección de las propiedades más importantes del mercurio.<sup>33</sup>

---

<sup>31</sup> Cotton, A., & Wilkinson, G., 1986. Química inorgánica avanzada. Limusa.

<sup>32</sup> Steele, D., 1971. Química de los elementos metálicos. Alhambra.

<sup>33</sup> Emsley, J., 1989. The elements, Oxford.

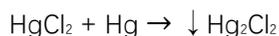
Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del mercurio elemental.

Propiedad	Hg
<b>Electronegatividad</b>	2,00 (Pauling)
<b>Estado de oxidación</b>	
Hg(I) ( $d^{10}s^1$ )	Hg <sub>2</sub> F <sub>2</sub> , Hg <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> etc., sales Hg <sub>2</sub> <sup>2+</sup> , Hg <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O
Hg(II) ( $d^{10}$ )	HgO, HgS, HgF <sub>2</sub> , HgCl <sub>2</sub> , etc., sales Hg <sup>2+</sup> , [Hg(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ] <sup>2+</sup> (ac), HgN(OH), complejos ej. [Hg(SCN) <sub>4</sub> ] <sup>2-</sup> , Hg(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , etc.
<b>Radio (pm)</b>	Hg <sup>+</sup> 127; Hg <sup>2+</sup> 112
<b>Punto de fusión (°C)</b>	-38,87
<b>Punto de ebullición (°C)</b>	356,9
<b>Entalpía de ionización (KJ mol<sup>-1</sup>)</b>	
1 <sup>a</sup>	1006
2 <sup>a</sup>	1799
3 <sup>a</sup>	3309
<b>Densidad (g cm<sup>3</sup>)</b>	13,546 (0°C)
<b>Número atómico</b>	80
<b>Peso atómico</b>	200,59
<b>Isótopos naturales</b>	7

## A.1.2.1. Especies de mercurio (I)

El carácter de los compuestos de Hg(I) varía entre covalente e iónico-covalente.<sup>29</sup> A estos compuestos se les conoce también como mercuriosos y los más populares son los halogenuros<sup>31</sup>, de entre los que destaca el Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, conocido como calomelano.

El calomelano, o cloruro mercurioso, es un sólido blanco de estructura cristalina con iones  $[\text{Hg}-\text{Hg}]^{2+}$  que no reacciona con el agua. Tradicionalmente, se usaba en medicina y en electroquímica.<sup>32</sup> En medio acuoso se prepara fácilmente utilizando mercurio metálico a partir del ión  $\text{Hg}^{2+}$ :



Otros ejemplos de compuestos de  $\text{Hg(I)}$  son el sulfato mercurioso ( $\text{Hg}_2(\text{SO}_4)$ ), un sólido blanco soluble en agua, o el nitrato mercurioso ( $\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), cuya forma solo se conoce dihidratada.<sup>31</sup> El ión mercurioso puede también formar complejos estables, aunque la reacción de dismutación es muy favorable debido a la gran estabilidad de los complejos de  $\text{Hg(II)}$ <sup>34</sup>:



### A.1.2.2. Especies de mercurio (II)

El mercurio forma por interacción directa con el oxígeno, a temperaturas de unos 300°C, el óxido rojo de mercurio,  $\text{HgO}$ , el cual a temperaturas más altas se descompone fácilmente:



En medio acuoso, el mercurio inorgánico se combina con el  $\text{OH}^-$  para dar la forma amarilla del óxido. Ambas formas, la roja y la amarilla, se diferencian únicamente en el tamaño de las partículas.<sup>31</sup>

El  $\text{Hg(II)}$  también se puede combinar con el S, para dar a su vez varias formas de  $\text{HgS}$ ; por un lado, la forma roja, de red cristalina distorsionada de cloruro de sodio con cadenas  $\text{Hg-S}$  que, como se comentaba anteriormente, representa la forma mineral de Hg más abundante en el planeta; por otro lado, la forma negra, con

---

<sup>34</sup> Carriedo, G. A. C., 2006. Introducción a la química inorgánica. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo.

estructura de blenda de zinc, insoluble en disoluciones acuosas e inestable con respecto a la forma roja.<sup>31</sup>

En lo que refiere a los dihaluros, el más común es el  $\text{HgCl}_2$ , incoloro y cuyos usos vinieron asociados a la medicina al igual que los del calomelano.<sup>32</sup> Se pueden igualmente encontrar  $\text{HgF}_2$ ,  $\text{HgBr}_2$  y  $\text{Hgl}_2$ , de carácter covalente a excepción del fluoruro. Entre las sales de mercurio (II) destacan el nitrato, el sulfato y el perclorato, de carácter claramente iónico.<sup>31</sup>

El mercurio en estado de oxidación II posee una química de coordinación muy rica, lo que le permite formar complejos con todo tipo de ligandos y estereoquímicas<sup>34</sup>, siendo los complejos con ligandos que contienen fósforo, nitrógeno y azufre, los más estables.<sup>31</sup>

### A.1.2.3. Especies orgánicas de mercurio

Se conocen un gran número de compuestos organometálicos de mercurio de los tipos  $\text{RHgX}$  y  $\text{R}_2\text{Hg}$ . Los compuestos del tipo  $\text{RHgX}$  son sólidos cristalinos, mientras que los del tipo  $\text{R}_2\text{Hg}$  son líquidos extremadamente tóxicos o sólidos de bajo punto de fusión. Estos compuestos organometálicos presentan enlaces Hg-C relativamente débiles, por lo que pueden ser sustituidos por metales que forman enlaces más fuertes con el carbono.<sup>30</sup>

Como ya se pudo adivinar, de entre todos los compuestos orgánicos de Hg destaca el ión metilmercurio ( $\text{MeHg}^+$ ), que se encuentra generalmente en la forma  $\text{MeHgCl}$ . Este ión se enlaza fuertemente con el S y el Se, por lo que su reacción con el grupo mercapto ( $-\text{SH}$ ) de proteínas, péptidos, etc., tiene relación con su carácter tóxico.<sup>31</sup>

Son comunes también el dimetilmercurio ( $\text{Me}_2\text{Hg}$ ), líquido volátil de carácter covalente, el difenilmercurio ( $\text{Ph}_2\text{Hg}$ ), sólido antiséptico y desinfectante, y el ión

etilmercurio (EtHg<sup>+</sup>), que desató controversia a raíz del empleo de vacunas con Tiomersal.<sup>30,35</sup>

### A.1.3. Los isótopos de mercurio

Según la definición clásica postulada en la década de 1910, los isótopos son átomos de un mismo elemento con el mismo número de protones, pero diferente número de neutrones. Esto hace que, aunque compartan entre sí la mayor parte de sus propiedades químicas, al diferir en masa, presenten propiedades físicas ligeramente diferentes.<sup>36</sup>

Únicamente 21 elementos de la tabla periódica son monoisotópicos así pues, la mayoría poseen dos o más isótopos, muchos de los cuales son estables en la naturaleza. Existen a su vez isótopos radioactivos, formados durante la creación del universo y que hace tiempo decayeron en isótopos estables, aunque también se pueden encontrar isótopos, como los 'padres' del plomo (<sup>238</sup>U, <sup>235</sup>U y <sup>232</sup>Th), que no han decaído por completo.<sup>37</sup>

Concretamente, el Hg posee siete isótopos estables (<sup>196</sup>Hg, <sup>198</sup>Hg, <sup>199</sup>Hg, <sup>200</sup>Hg, <sup>201</sup>Hg, <sup>202</sup>Hg y <sup>204</sup>Hg), no obstante, han sido también descubiertos isótopos radioactivos artificiales como el <sup>197</sup>Hg o el <sup>203</sup>Hg, con tiempos de vida relativamente cortos.<sup>38</sup> De los isótopos estables de Hg, el más abundante es el <sup>202</sup>Hg, seguido del <sup>200</sup>Hg con abundancias del 29,73 y 23,14%, respectivamente, conforme al Instituto

---

<sup>35</sup> Baker, J.P., 2008. Mercury, vaccines, and autism: One controversy, three histories. *Am. J. Public Health* 98, 244–253.

<sup>36</sup> Soddy, F., 1911. The chemistry of mesothorium. *J. Chem. Soc.*, 99, 72–83.

<sup>37</sup> Meija, J., Coplen, T.B., Berglund, M., Brand, W.A., De Bièvre, P., Gröning, M., Holden, N.E., Irrgeher, J., Loss, R.D., Walczyk, T., Prohaska, T., 2016. Isotopic compositions of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 88, 293–306.

<sup>38</sup> Friedlander, G., & Wu, C. S., 1943. Radioactive Isotopes of Mercury. *Physical Review*, 63(7-8), 227.

Nacional de Estándares y Tecnología (NIST)<sup>39</sup>, como se puede observar en la **Tabla 2**, donde se recogen las propiedades físicas y químicas de los isótopos naturales de Hg.<sup>33</sup>

**Tabla 2.** Propiedades de los isótopos naturales de mercurio.

Isótopo ( <sup>xxx</sup> Hg)	Masa atómica (m <sub>a</sub> /u)	Abundancia natural (%)	Tiempo de vida medio (T <sub>1/2</sub> )	Espín nuclear (I)	Momento magnético (μ/μ <sub>N</sub> )
<sup>196</sup> Hg	195,9658	0,16	Estable	0+	0
<sup>198</sup> Hg	197,9668	10,04	Estable	0+	0
<sup>199</sup> Hg	198,9683	16,94	Estable	½-	+0,50271
<sup>200</sup> Hg	199,9682	23,14	Estable	0+	0
<sup>201</sup> Hg	200,9703	13,17	Estable	3/2-	-0,55671
<sup>202</sup> Hg	201,9706	29,73	Estable	0+	0
<sup>204</sup> Hg	203,9735	6,83	Estable	0+	0

A pesar de que pueda parecer que las abundancias naturales de los isótopos de mercurio son estables debido a su procedencia no radioactiva, en realidad sí que presentan pequeñas variaciones.<sup>39</sup> A estas variaciones isotópicas se las conoce como fraccionamiento isotópico y, en este caso en particular, pueden ser debidas a reacciones biogeoquímicas y/o a causas físicas, como procesos evaporación o difusión a través de membranas.<sup>40</sup>

El estudio de las variaciones isotópicas naturales de Hg aporta mucha información, no solo en el ámbito biogeoquímico, sino también en medio

<sup>39</sup> Blum, J.D., Sherman, L.S., Johnson, M.W., 2014. Mercury isotopes in earth and environmental sciences. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 42, 249–269.

<sup>40</sup> Foucher, D., Hintelmann, H., 2006. High-precision measurement of mercury isotope ratios in sediments using cold-vapor generation multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 384, 1470–1478.

ambiente, medicina, arqueología, etc. Combinando el estudio de los isótopos del propio elemento pesado con el estudio de los isótopos de elementos ligeros que componen las especies de Hg, se puede recabar aún mucha más información.

El trabajo con los isótopos nos permite distinguir varios grandes campos: (I) el uso de isótopos estables de Hg enriquecidos, (II) el uso de isótopos de Hg radioactivos, (III) el uso de isótopos ligeros que componen las especies de Hg, (IV) el estudio de la variabilidad isotópica del carbono de las especies orgánicas de Hg y (V) el estudio de la abundancia natural del Hg.<sup>41</sup> Se ahondará en algunos de estos conceptos en secciones posteriores.

### A.1.4. Tipos de muestra

El rango de matrices en las que se puede encontrar mercurio es muy variado. Muchos estudios se centran en el análisis de las concentraciones del mercurio total de las muestras, aunque la especiación del mercurio, principalmente en los campos ambiental y biológico, ha ganado mucha importancia en los últimos años.<sup>42</sup> Uno de los mayores problemas que generalmente presentan las muestras suelen ser las bajas concentraciones de metal, lo que resulta limitante sobre todo a la hora de estudiar el fraccionamiento isotópico, tanto del mercurio total, como el de las especies.

La mayor parte de los estudios ambientales se enfocan en el análisis de muestras de agua, sedimentos, suelos, lodos de depuradora y pescado o marisco.<sup>39,42</sup> En matrices medioambientales las concentraciones de mercurio suelen variar entre las pocas partes por trillón (ppt) y las partes por millón (ppm),

---

<sup>41</sup> Tsui, M.T.K., Blum, J.D., Kwon, S.Y., 2020. Review of stable mercury isotopes in ecology and biogeochemistry. *Sci. Total Environ.* 716, 135386.

<sup>42</sup> Ibáñez-Palomino, C., López-Sánchez, J.F., Sahuquillo, A., 2012. Certified reference materials for analytical mercury speciation in biological and environmental matrices: Do they meet user needs?; a review. *Anal. Chim. Acta* 720, 9–15.

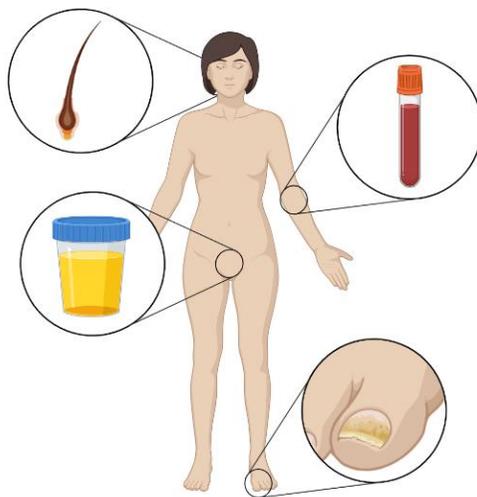
encontrándose en aguas contaminadas concentraciones normalmente en el nivel de las partes por billón (ppb).<sup>42</sup>

Todas las poblaciones del mundo están en contacto de algún que otro modo con el mercurio por lo que, para evaluar dicha exposición, se puede medir un número variado biomarcadores, siendo los más comunes pelo, sangre, orina y uñas, como se observa en la **Figura 4**. La selección del biomarcador depende de factores como la fuente de exposición, la forma química del mercurio objeto de estudio o el tiempo de exposición y su recolección debe seguir una serie de protocolos homologados.<sup>43</sup>

Cada uno de los biomarcadores puede presentar una serie de ventajas frente a los demás. La orina, por ejemplo, es una muestra relativamente fácil de analizar y su recolección no es invasiva. Las muestras de pelo son también fáciles de recoger, son estables en el tiempo, y, además, su transporte es sencillo, lo que permite acceder a poblaciones remotas y, por tanto, más vulnerables. En ambientes muy contaminados, sin embargo, la interpretación de los resultados de las muestras de cabello puede resultar algo dificultosa debido a los diferentes potenciales orígenes del mercurio, como la dieta o la minería artesanal de oro.<sup>43</sup>

---

<sup>43</sup> Basu N, Horvat M, Evers DC, Zastenskaya I, Weihe P, Tempowski J, 2018. A State-of-the-Science Review of Mercury Biomarkers in Human Populations Worldwide between 2000 and 2018. *Environ Health Perspect.* 126(10), 106001.



**Figura 4.** Principales biomarcadores (pelo, sangre, orina y uñas) usados en la evaluación de la exposición humana a mercurio.

### A.1.5. Materiales de referencia

Una vez que se analizan las muestras se debe asegurar la calidad de los resultados, ya que estos llegan incluso a tener consecuencias económicas, sociales o políticas, por lo que, a tal fin, se utilizan materiales de referencia (RM), que pueden estar a su vez certificados (CRM).<sup>44</sup> Estos materiales deben imitar la composición de la matriz y los niveles de concentración de las muestras reales para garantizar la exactitud de los resultados, no obstante, no todas las matrices cuentan con materiales de referencia para mercurio. Cuando no se dispone de herramientas que aporten garantías de calidad son comunes otros procedimientos, como la fortificación de las muestras/blancos.<sup>45</sup>

---

<sup>44</sup> Rutkowska, M., Namieśnik, J., Konieczka, P., 2020. Production of certified reference materials - homogeneity and stability study based on the determination of total mercury and methylmercury. *Microchem. J.* 153.

<sup>45</sup> Padariya, C., Rutkowska, M., Konieczka, P., 2022. The importance and availability of marine certified reference materials. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 52, 3322-3373.

Son varias las instituciones que se encargan de la producción de materiales de referencia como el Instituto Nacional de Estudios Ambientales (NIES), el Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA), el Centro Común de Investigación (JRC), el Consejo Nacional de Investigación de Canadá (NRC-CNRC), el Instituto Nacional de la Enfermedad de Minamata (NIMD), etc. Estos organismos deben cumplir normas muy estrictas para asegurar la estabilidad de los materiales con el tiempo, la homogeneidad y la representatividad de los mismos.<sup>42,45</sup>

Respecto a los materiales de referencia disponibles para la determinación de las especies de mercurio destacan las matrices de sedimentos marinos, tejidos de pescado, pelo humano o sangre de cabra, algunos de los cuales están recogidos en la **Tabla 3**. Cabe mencionar que la base de datos internacional de materiales de referencia certificados (COMAR)<sup>46</sup> y la base de datos del Instituto Virtual Europeo de Análisis de Especies (EVISA)<sup>47</sup> son muy útiles para la búsqueda de materiales de referencia. Los datos sobre la composición isotópica de los materiales de referencia son muy limitados y la mayor parte de los estudios se centran en la composición isotópica total<sup>48,49</sup> y no en la composición de las

---

<sup>46</sup> COMAR, International database for Certified Reference Materials, accessed 30<sup>th</sup> November 2022 <http://www.comar.bam.de/en>, funded by BAM, Federal Institute for Materials Research and Testing.

<sup>47</sup> EVISA, European Virtual Institute for Speciation Analysis, accessed 30<sup>th</sup> November 2022 <http://www.speciation.net/App/Materials/index.html>, funded by the EU through the Fifth Framework Programme (G7RT- CT- 2002- 05112).

<sup>48</sup> Yamakawa, A., Takeuchi, A., Shibata, Y., Bérail, S., Donard, O.F.X., 2016. Determination of Hg isotopic compositions in certified reference material NIES No. 13 Human Hair by cold vapor generation multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Accredit. Qual. Assur.* 21, 197–202.

<sup>49</sup> Yamakawa, A., Bérail, S., Amouroux, D., Tessier, E., Barre, J., Sano, T., Nagano, K., Kanwal, S., Yoshinaga, J., Donard, O.F.X., 2020. Hg isotopic composition and total Hg mass fraction in NIES Certified Reference Material No. 28 Urban Aerosols. *Anal. Bioanal. Chem.* 412, 4483–4493.

## Introducción

---

especies, aunque existen algunos trabajos que sí reportan valores para materiales como el BCR-464 o el IAEA-085.<sup>50</sup>

**Tabla 3.** Algunos materiales de referencia disponibles para la especiación de mercurio.

Matriz	Código	Proveedor	Especificación
Pelo humano	ERM-DB001	JRC	HgT
Pelo humano	IAEA-085	IAEA	MeHg, HgT
Pelo humano	IAEA-086	IAEA	MeHg, HgT
Pelo humano	NIMD-1	NIMD	MeHg, HgT
Pelo humano	CRM N°13	NIES	MeHg, HgT
Sangre de cabra	SRM-955c (Niveles 1, 2, 3 y 4)	NIST	HgT MeHg, EtHg, Hg(II), HgT (Nivel 3)
Sedimento marino	BCR-277R	JRC	HgT
Sedimento de lago	BCR-280R	JRC	HgT
Sedimento costero	IAEA-456	IAEA	MeHg, HgT
Sedimento marino contaminado	IAEA-356	IAEA	MeHg
Tejido de ostras	SRM-1566b	NIST	MeHg, HgT
Atún	BCR-463	JRC	MeHg, HgT
Hígado de cazón	DOLT-4	NRC - CNRC	MeHg, HgT
Proteína de pescado	DORM-4	NRC - CNRC	MeHg, HgT
Hepatopáncreas de langosta	TORT-3	NRC - CNRC	MeHg, HgT

---

<sup>50</sup> Epov, V.N., Rodriguez-Gonzalez, P., Sonke, J.E., Tessier, E., Amouroux, D., Bourgoïn, L.M., Donard, O.F.X., 2008. Simultaneous determination of species-specific isotopic composition of Hg by gas chromatography coupled to multicollector ICPMS. Anal. Chem. 80, 3530–3538.

## A.2. Determinación de la concentración de las especies de mercurio

La forma química que presenta un elemento determina su impacto en el medio ambiente y en los organismos, por lo que la importancia que tiene cuantificar de manera correcta las especies de mercurio está clara.<sup>51</sup> Aunque las concentraciones de las diferentes especies y del mercurio total se pueden calcular utilizando diversos tipos de calibración, como calibrados externos, por adiciones estándar<sup>52</sup> o por ajuste de matriz<sup>53</sup>, la técnica por excelencia utilizada para la cuantificación de mercurio es el análisis por dilución isotópica (IDA)<sup>51</sup>, basada en la medida de las relaciones isotópicas en una muestra.

### A.2.1. El concepto de la dilución isotópica

La modificación de la composición isotópica de un elemento o compuesto para su determinación en una muestra mediante la adición del mismo elemento o compuesto enriquecido (trazador) recibe el nombre de dilución isotópica.<sup>54</sup> Este concepto se desarrolló inicialmente en el campo de la ecología, donde se le conoce como método de captura y recaptura, y se aplicó a experimentos de conteo de individuos.<sup>55,56</sup>

---

<sup>51</sup> Björn, E., Larsson, T., Lambertsson, L., Skyllberg, U., Frech, W., 2007. Recent advances in mercury speciation analysis with focus on spectrometric methods and enriched stable isotope applications. *Ambio* 36, 443–451.

<sup>52</sup> Massart, D. L., Vandeginste, B. G., Buydens, L. M., Lewi, P. J., Smeyers-Verbeke, J., Jong, S. D., 1998. *Handbook of chemometrics and qualimetrics*. Elsevier Science Inc.

<sup>53</sup> Miranda-Andrades, J.R., Khan, S., Toloza, C.A.T., Maciel, R.M., Escalfoni, R., Tristão, M.L.B., Aucelio, R.Q., 2019. Speciation and ultra trace determination of mercury in produced waters from offshore drilling operations using portable instrumentation and matrix-matching calibration. *Microchem. J.* 146, 1072–1082.

<sup>54</sup> Alonso, J., Gonzalez, P., 2013. *Isotope dilution mass spectrometry*. Royal Society of Chemistry.

<sup>55</sup> Petersen, C. G., 1895. The yearly immigration of young plaice into the Limfjord from German Sea. Report of the Danish Biological Station to the Home Department. 6,5.

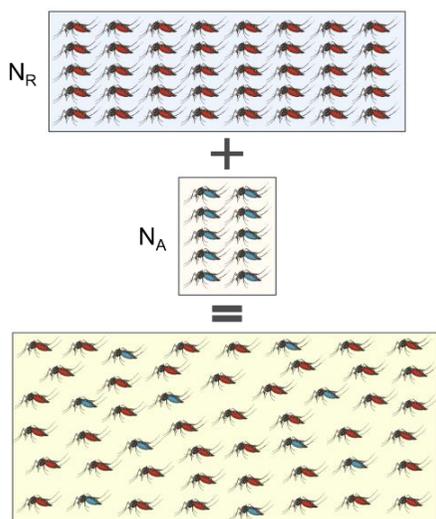
<sup>56</sup> Seber, G. A., Schwarz, C. J., 2002. Capture-recapture: before and after EURING 2000. *Journal of Applied Statistics*, 29(1-4), 5-18.

## Introducción

---

Los primeros estudios de dilución isotópica en el ámbito de la química se realizaron con isótopos radioactivos<sup>57</sup>, aunque hoy en día estos han quedado relegados al campo de la biología para estudios *in vivo* e *in vitro*, dejando el espacio libre a las aplicaciones con isótopos estables, tanto de elementos ligeros ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ), utilizados en el marcaje de compuestos, como de elementos pesados ( $^{199}\text{Hg}$ ,  $^{201}\text{Hg}$ , etc.).

Tanto en el campo de la química analítica como en el de la biología, el fundamento de la técnica es el mismo por lo que, asumiendo un sistema cerrado, se puede explicar con los mosquitos “marcados” de la imagen de la **Figura 5**.



**Figura 5.** Experimento clásico de la dilución isotópica con mosquitos rojos y azules.

Se desea averiguar un número desconocido de individuos, en este caso mosquitos rojos, evitando los inconvenientes del conteo manual. Así pues, se mezclan los mosquitos rojos con un número conocido de mosquitos azules. Una vez que ambos grupos se han equilibrado, se extrae una muestra de la mezcla para determinar la proporción entre el número de mosquitos rojos (R) y azules

---

<sup>57</sup> Hevesy, G. V., & Hobbie, R., 1931. Lead content of rocks. *Nature*, 128(3242), 1038-1039.

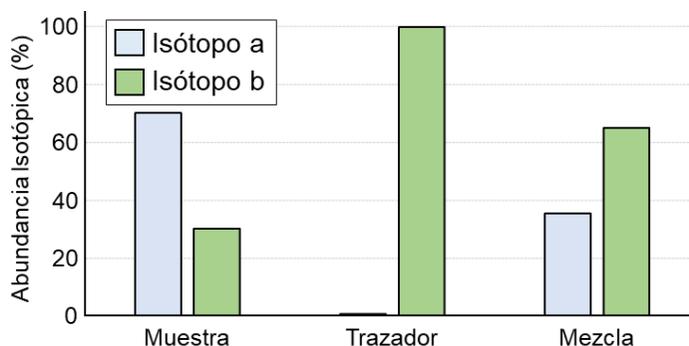
(A). El número total de mosquitos rojos ( $N_R$ ) se puede conocer a partir de la relación de mosquitos obtenida de la muestra extraída y el número de mosquitos azules ( $N_A$ ), conocido previamente:

$$N_R = N_A \frac{R}{A} \quad (1)$$

Cabe señalar que la principal ventaja del procedimiento recae en que, cualquier pérdida de mosquitos, una vez se han equilibrado las partes, no afectará al resultado final, pues todas las alícuotas de muestra contendrán la misma relación  $R/A$ .<sup>54</sup>

### A.2.2. Ecuación de la dilución isotópica

Para que la dilución isotópica pueda aplicarse es necesario que el elemento a analizar posea, como mínimo, dos isótopos estables o radioactivos de vida media/larga, como se ilustra en la **Figura 6**.



**Figura 6.** Principio de la dilución isotópica para un elemento bi-isotópico (a y b) adaptado de Alonso, J. *et al.*<sup>54</sup>

Se selecciona un trazador enriquecido en el isótopo **b** y se combina con una muestra cuyo isótopo más abundante es el isótopo **a**, de tal manera que las abundancias isotópicas (y las relaciones isotópicas) de la mezcla sean intermedias. Las abundancias de la mezcla dependerán de la cantidad de trazador añadido y de la cantidad inicial del elemento en la muestra por lo que, a través de la medida

## Introducción

---

de las relaciones isotópicas de dicha mezcla, se podrá calcular la concentración inicial del elemento, lo que es demostrable matemáticamente.

Siendo  $N_s$  el número de moles de un elemento en una muestra y  $N_t$  el número de moles del mismo elemento en el trazador, el número de moles del elemento en la mezcla será ( $N_m$ ):

$$N_m = N_s + N_t \quad (2)$$

Si para el sistema bi-isotópico (a y b) se conocen las abundancias isotópicas tanto en la muestra ( $A_m$ ) como en el trazador ( $A_t$ ), entonces se pueden plantear los siguientes balances de masa:

$$N_m A_m^a = N_s A_s^a + N_t A_t^a \quad (3)$$

y

$$N_m A_m^b = N_s A_s^b + N_t A_t^b \quad (4)$$

Si se dividen las ecuaciones **(3)** y **(4)** se obtiene la relación isotópica de los isótopos (a/b) en la mezcla ( $R_m$ ) y si se elimina el término  $N_m$  se obtiene la expresión:

$$R_m = \frac{N_s A_s^a + N_t A_t^a}{N_s A_s^b + N_t A_t^b} \quad (5)$$

Reagrupando la ecuación **(5)** de acuerdo con  $N_s$ :

$$N_s = N_t \cdot \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_s^a - R_m A_s^b} \quad (6)$$

Si se conocen el número de átomos o de moles añadidos con el trazador,  $N_t$ , y las composiciones isotópicas de la muestra y del trazador, entonces el número de átomos o moles de la muestra se puede calcular fácilmente a partir de la medida de las relaciones isotópicas de la mezcla,  $R_m$ .

Multiplicando y dividiendo la ecuación (6) por la abundancia isotópica del isótopo b en el trazador ( $A_t^b$ ) y por la abundancia isotópica del isótopo a en la muestra ( $A_s^a$ ) se obtiene la ecuación final:

$$N_s = N_t \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left( \frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad (7)$$

donde  $R_s = A_s^b/A_s^a$  es la relación isotópica (b/a) en la muestra y  $R_t = A_t^a/A_t^b$  es la relación isotópica (a/b) en el trazador.

Esta ecuación final puede escribirse en términos de concentración, C, si se incluyen las masas tomadas de la muestra y el trazador ( $m_s$  y  $m_t$ , respectivamente) y los pesos atómicos ( $M_s$  y  $M_t$ ):

$$C_s = C_t \cdot \frac{m_t}{m_s} \cdot \frac{M_s}{M_t} \cdot \frac{A_t^b}{A_s^a} \cdot \left( \frac{R_m - R_t}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad (8)$$

A partir de esta última ecuación, la concentración del elemento en la muestra,  $C_s$ , se puede determinar a partir de la medida de  $R_m$ , ya que el resto de los parámetros de la ecuación son conocidos.

### A.2.3. Análisis por dilución isotópica específica de especies

La dilución isotópica puede utilizarse para el análisis de moléculas orgánicas o de elementos, distinguiéndose dos modos fundamentales cuando se usa con fines de especiación: dilución isotópica inespecífica y dilución isotópica específica.

En el modo inespecífico, el equilibrado entre el analito y el trazador no se produce hasta el final del proceso analítico, cuando las especies de la muestra ya se han separado completamente, por lo que no ofrece todas las ventajas de la dilución isotópica convencional. Sin embargo, este modo es especialmente útil en casos en los que los trazadores enriquecidos no están disponibles o no se conoce la composición exacta de las especies que se quiere determinar, puesto que se

utiliza un trazador genérico. En el caso concreto de la cuantificación de las especies de mercurio, son pocos los estudios en los que se utilice la dilución isotópica inespecífica.<sup>58, 59, 60</sup>

Por su parte, la dilución isotópica específica puede considerarse como un método primario de medida, siempre y cuando se cumplan una serie de requisitos como: que no haya pérdidas de analito previas al equilibrado de este con el trazador; que el analito y el trazador se comporten idénticamente durante el proceso analítico; que la medida de las relaciones isotópicas esté libre de interferencias o que los blancos estén libres de contaminación. En este modo, los trazadores isotópicos enriquecidos utilizados deben ser los adecuados para cada especie a determinar, pudiendo distinguirse entre trazadores isotópicos sencillos y múltiples.<sup>54</sup>

### A.2.3.1. Trazadores isotópicos sencillos

La mayor parte de las aplicaciones del análisis por dilución isotópica para especiación utilizan trazadores isotópicos enriquecidos en un mismo isótopo. El procedimiento analítico a seguir es relativamente simple, una vez que los trazadores ya han sido caracterizados en concentración y en composición isotópica y que las abundancias naturales de los isótopos de la muestra son conocidas: se pesa una alícuota de la muestra y se mezcla con alícuotas pesadas de los trazadores, de tal manera que la proporción entre las especies y su

---

<sup>58</sup> Gelaude, I., Dams, R., Resano, M., Vanhaecke, F., Moens, L., 2002. Direct determination of methylmercury and inorganic mercury in biological materials by solid sampling-electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-isotope dilution-mass spectrometry. *Anal. Chem.* 74, 3833–3842.

<sup>59</sup> Resano, M., Gelaude, I., Dams, R., Vanhaecke, F., 2005. Solid sampling-electrothermal vaporization-inductively coupled plasma mass spectrometry for the direct determination of Hg in different materials using isotope dilution with a gaseous phase for calibration. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 60, 319–326.

<sup>60</sup> Wehe, C.A., Pieper, I., Holtkamp, M., Thyssen, G.M., Sperling, M., Schwerdtle, T., Karst, U., 2014. On-line species-unspecific isotope dilution analysis in the picomolar range reveals the time- and species-depending mercury uptake in human astrocytes. *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1909–1916.

respectivo trazador sea de entre 0,1 y 10. Si la muestra se encuentra en estado sólido es necesario que el proceso de digestión sea completo, para asegurar un correcto equilibrio entre las especies y los trazadores.<sup>54</sup>

En caso de que la relación isotópica medida sea la del heteroátomo de las especies puede aplicarse directamente la ecuación de la dilución isotópica tradicional para el cálculo de las concentraciones **(8)**. Cuando relación isotópica medida es la del clúster molecular que contiene el heteroátomo de interés entonces se deben tener en consideración cuestiones como la pureza del mismo clúster y las abundancias del  $^{13}\text{C}$  o del  $^2\text{H}$  para obtener la relación isotópica real del heteroátomo.<sup>61</sup>

Para el análisis de Hg por medio de dilución isotópica con trazador simple se han sintetizado varias especies enriquecidas, aunque este tipo de dilución isotópica no corrige la posible degradación ni los fenómenos de interconversión de las especies durante el proceso analítico.<sup>54,61</sup>

### A.2.3.2. Trazadores isotópicos múltiples

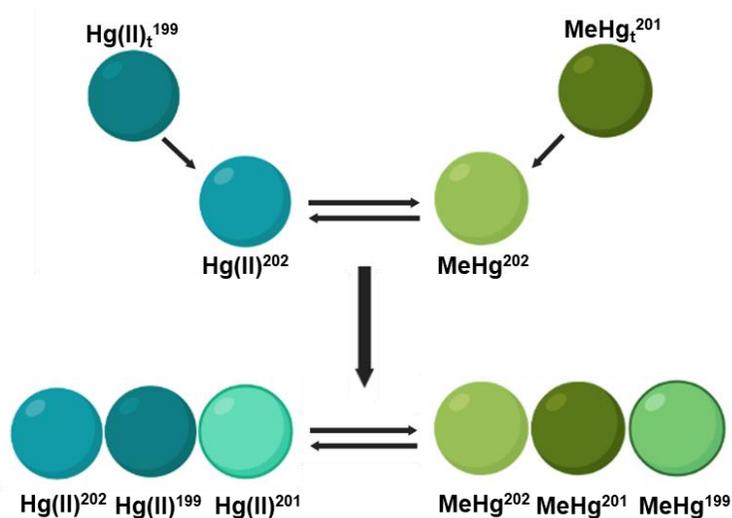
El Hg es uno de los pocos elementos para cuya especiación se utiliza la dilución isotópica con trazadores múltiples. El procedimiento analítico es el mismo que se aplica cuando se utilizan trazadores isotópicos sencillos, con la diferencia de que en este caso los trazadores presentan la marca en isótopos diferentes y que el planteamiento matemático es algo más complejo.<sup>61</sup>

La principal ventaja que presenta el uso de este tipo de trazadores recae en la capacidad de corrección de los posibles procesos de degradación o de interconversión de las especies durante el procedimiento analítico ya que, tras el equilibrio entre las especies naturales y las marcadas, cualquier fenómeno

---

<sup>61</sup> Rodríguez-González, P., Marchante-Gayón, J.M., García Alonso, J.I., Sanz-Medel, A., 2005. Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 60, 151–207.

afecta del mismo modo a ambas. Este efecto se muestra en la **Figura 7** donde se observa una interconversión entre el Hg(II) y el MeHg en un sistema ficticio de tres únicos isótopos (202, 201 y 199). La muestra, que contiene  $^{202}\text{Hg}$  en forma de Hg(II) y MeHg que se pueden interconvertir, es tratada con dos trazadores: Hg(II) enriquecido en  $^{199}\text{Hg}$  y MeHg enriquecido en  $^{201}\text{Hg}$ . Después del posible proceso de interconversión aparecen dos nuevas “huellas isotópicas” en cada compuesto: Hg(II) en forma de  $^{201}\text{Hg}$  y MeHg en forma de  $^{199}\text{Hg}$ . La cuantificación de estas dos nuevas huellas isotópicas permite calcular, y por tanto corregir, la magnitud de las reacciones de interconversión.



**Figura 7.** Ejemplo de corrección del fenómeno de interconversión entre el Hg(II) y el MeHg con dilución isotópica por trazador múltiple adaptado de Alonso, J. *et al.*<sup>54</sup>

Los trazadores múltiples se pueden utilizar, además de para el cálculo de concentraciones corrigiendo los fenómenos de interconversión y degradación, para el estudio del comportamiento de las especies en ecosistemas naturales u organismos vivos. Los primeros estudios en este campo fueron realizados en 1995 por Hintelmann, Evans y Villeneuve, con el fin de observar los fenómenos de

metilación y desmetilación de mercurio en sedimentos.<sup>62</sup> En este tipo de estudios se añade a los ecosistemas las especies isotópicas enriquecidas y, para cuantificar sus transformaciones, se adicionan posteriormente las mismas especies, pero enriquecidas en isótopos diferentes.<sup>61</sup>

La dilución isotópica con trazadores múltiples está limitada a concentraciones similares de las especies, ya que cuando estas son muy diferentes las incertidumbres o los factores de degradación pueden llegar a ser muy elevados. Como inconveniente de la técnica, cabe también destacar, que el cálculo de las incertidumbres es complejo, para lo que la mejor alternativa es el método de Kragten<sup>63</sup>. A su vez, es necesario que la composición isotópica de las especies sea conocida y que se pueda asegurar la estabilidad de los trazadores.<sup>61</sup>

---

<sup>62</sup> Hintelmann, H., Evans, R. D., Villeneuve, J. Y., 1995. Measurement of mercury methylation in sediments by using enriched stable mercury isotopes combined with methylmercury determination by gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 10(9), 619-624.

<sup>63</sup> Kragten, J.,1994. Tutorial review. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst*, 119(10), 2161-2165.

### A.3. Composición isotópica del mercurio

Como se comentaba en el apartado anterior (**sección A.1.3.**), el Hg posee siete isótopos estables ( $^{196}\text{Hg}$ ,  $^{198}\text{Hg}$ ,  $^{199}\text{Hg}$ ,  $^{200}\text{Hg}$ ,  $^{201}\text{Hg}$ ,  $^{202}\text{Hg}$  y  $^{204}\text{Hg}$ ) entre los que hay una diferencia de masa relativa de un 4%.<sup>64</sup> El estudio de los isótopos de mercurio comenzó hace ya más de un siglo<sup>65</sup> y desde entonces, y con las mejoras en exactitud y precisión en los equipos analíticos, se ha ido obteniendo información que aporta algo de luz a las fuentes y al destino del elemento en el medio ambiente.<sup>66</sup>

El fraccionamiento isotópico del Hg se explica gracias a las diferencias entre la masa de los isótopos, que afectan a la velocidad y a la difusión de los átomos y las moléculas. Estas diferencias de masa afectan también a las frecuencias vibracionales y rotacionales, alterando las características espectrales y las energías termodinámicas. Todos estos efectos provocan variaciones entre la reactividad de los isótopos, que se reparten, por tanto, desigualmente entre reactivos y productos. Generalmente, la división entre reactivos y productos es proporcional a estas diferencias de masa (fraccionamiento dependiente de la masa (MDF)), aunque, puede no seguir una proporción que dependa de la masa de los isótopos (fraccionamiento independiente de la masa (MIF)).<sup>67</sup>

---

<sup>64</sup> Blum, J.D., Bergquist, B.A., 2007. Reporting of variations in the natural isotopic composition of mercury. *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 353–359.

<sup>65</sup> Brønsted, J., von Hevesy, G., 1920 *Nature* 106, 144.

<sup>66</sup> Bessinger, B.A., 2014. Use of Stable Isotopes to Identify Sources of Mercury in Sediments: A Review and Uncertainty Analysis. *Environ. Forensics* 15, 265–280.

<sup>67</sup> Dauphas, N., Schauble, E.A., 2016. Mass Fractionation Laws, Mass-Independent Effects, and Isotopic Anomalies. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 44, 709–783.

### A.3.1. Fraccionamiento dependiente de la masa

Debido a que las variaciones isotópicas naturales son pequeñas se reportan en ‰ como desviaciones a un estándar de referencia en notación delta ( $\delta$ ):

$$\delta^{XXX}\text{Hg} (\text{‰}) = \left( \frac{\left( \frac{XXX\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{corregido}}}{\left( \frac{XXX\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{referencia}}} - 1 \right) * 1000 \quad (9)$$

donde XXX son los isótopos de Hg entre el 196 y el 204.

La elección del isótopo  $^{198}\text{Hg}$  como denominador de la relación isotópica fue recomendada por Blum y Bergquist en el año 2007, debido a que se trata del isótopo de menor masa con una abundancia suficiente para medirse con buena precisión (a diferencia del isótopo  $^{196}\text{Hg}$ ). Además, Blum y Bergquist también sugirieron el estándar NIST SRM 3133 como mejor candidato para reportar los datos y facilitar así la comparación entre laboratorios y la evaluación de la exactitud y precisión de los resultados publicados.<sup>64</sup>

El fraccionamiento isotópico de un elemento entre dos sustancias, A y B, puede describirse mediante el factor de fraccionamiento isotópico  $\alpha$ :

$$\alpha_{A/B} = \frac{R_A}{R_B} \quad (10)$$

donde  $R_A$  y  $R_B$  son las relaciones entre los isótopos pesados y los isótopos ligeros en las sustancias A y B, respectivamente.<sup>68</sup> Puesto a que los isótopos más ligeros son normalmente más reactivos que los más pesados existe un fraccionamiento isotópico dependiente de la masa de los isótopos más ligeros en la sustancia más reactiva.

Como  $\alpha$  es cercano a la unidad, se puede hacer la siguiente aproximación:

---

<sup>68</sup> Yin, R., Feng, X., Shi, W., 2010. Application of the stable-isotope system to the study of sources and fate of Hg in the environment: A review. *Appl. Geochemistry* 25, 1467–1477.

$$10^3 \ln \alpha_{A/B} \approx \delta_A - \delta_B = \Delta_{A-B} \quad (11)$$

donde  $\Delta_{A-B}$  es el fraccionamiento entre las fases A y B, que puede incluir procesos cinéticos o de equilibrio.

El MDF de equilibrio tiene lugar cuando las velocidades de reacción durante el proceso de fraccionamiento son iguales. El MDF cinético es unidireccional y ocurre debido a que los enlaces moleculares con los isótopos más ligeros se rompen antes que los más pesados, dando factores de fraccionamiento distintos a los del MDF de equilibrio.<sup>66</sup>

El factor de fraccionamiento se ha caracterizado para varios procesos, principalmente cinéticos, de entre los que destaca la destilación de Rayleigh. Este caso de fraccionamiento cinético puede dar lugar a fraccionamientos extremos, ya que los productos de reacción se eliminan irreversiblemente del sistema, como durante la volatilización, oxidación o evaporación del Hg(0).<sup>66</sup>

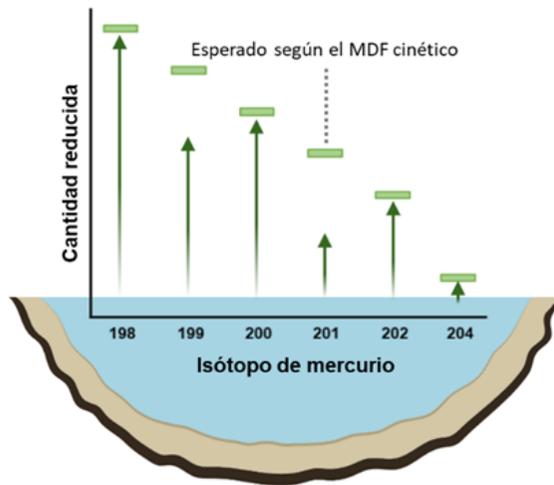
### A.3.2. Fraccionamiento independiente de la masa

Junto al fraccionamiento dependiente de la masa se ha descrito también un fraccionamiento independiente de la masa notable para los isótopos impares (<sup>199</sup>Hg y <sup>201</sup>Hg), como se observa en la **Figura 8**. Sin embargo, también se ha observado MIF para los isótopos pares.<sup>69, 70</sup>

---

<sup>69</sup> Lamborg, C., 2007. A new twist for Mercury. *Science*. 318, 402–403.

<sup>70</sup> Blum, J.D., Sherman, L.S., Johnson, M.W., 2014. Mercury isotopes in earth and environmental sciences. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 42, 249–269.



**Figura 8.** Fraccionamiento independiente de la masa durante el intercambio de Hg(0) entre el aire y el agua adaptado de Lamborg, C..<sup>69</sup>

Para la descripción del MIF es necesaria una notación delta adicional ( $\Delta^{xxx}\text{Hg}$ , ‰), que describe la diferencia entre los valores  $\delta$  medidos y los valores  $\delta$  predichos según el fraccionamiento dependiente de la masa cinético<sup>64</sup>:

$$\Delta^{204}\text{Hg} \approx \delta^{204}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 1,493) \quad (12)$$

$$\Delta^{201}\text{Hg} \approx \delta^{201}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0,752) \quad (13)$$

$$\Delta^{200}\text{Hg} \approx \delta^{200}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0,502) \quad (14)$$

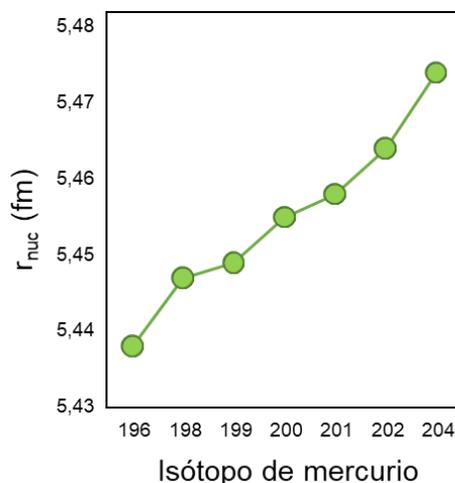
$$\Delta^{199}\text{Hg} \approx \delta^{199}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0,252) \quad (15)$$

Son dos los mecanismos que podrían explicar el fraccionamiento independiente de la masa: el efecto del volumen nuclear (NVE) y el efecto magnético isotópico (MIE). Este segundo efecto influye únicamente en los isótopos impares, lo que justificaría el mayor grado de MIF que sufren.

#### A.3.2.1. Volumen nuclear

El volumen nuclear de los isótopos de Hg no escala linealmente con la masa, como se muestra en la gráfica de la **Figura 9**.<sup>67</sup> En particular, los núcleos con

números impares de neutrones tienden a tener radios de carga nuclear similares a los de los isótopos con un neutrón menos, lo que hace que su densidad de carga sea mayor a la esperada. Esto explicaría la diferencia de comportamiento entre los isótopos, aunque para predecir las anomalías superiores al 0.5‰ es necesario tener también en cuenta el efecto del espín magnético.<sup>71, 72</sup>



**Figura 9.** Raíz del cuadrado del radio de la carga nuclear ( $r_{nuc}$ ) de los isótopos de mercurio adaptado de Dauphas, N. *et al.*<sup>67</sup>

### A.3.2.2. Espín magnético

La causa más probable del elevado MIF observado principalmente en reacciones fotoquímicas se atribuye al efecto del espín magnético (MIE). Los isótopos impares del Hg tienen espín nuclear y momentos magnéticos nucleares diferentes a cero, que pueden interactuar con los momentos magnéticos de los electrones, lo que se conoce como acoplamiento hiperfino. Estas interacciones suelen ser muy débiles, pero en reacciones radicalarias en las que se produce una

---

<sup>71</sup> Bergquist, B.A., Blum, J.D., 2009. The odds and evens of mercury isotopes: Applications of mass-dependent and mass-independent isotope fractionation. *Elements* 5, 353–357.

<sup>72</sup> Schauble, E.A., 2007. Role of nuclear volume in driving equilibrium stable isotope fractionation of mercury, thallium, and other very heavy elements. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71, 2170–2189.

conversión del estado triplete a singlete pueden inducir fraccionamiento isotópico.

El MIE es un efecto puramente cinético, que depende de muchos factores, por lo que en la naturaleza se da en contadas ocasiones, como en las ya mencionadas reacciones fotoquímicas, que tienen lugar preferiblemente en ambientes acuáticos.<sup>71</sup>

### A.3.2.3. Fraccionamiento independiente de la masa en los isótopos pares

Varios estudios han observado MIF en los isótopos pares de mercurio en muestras atmosféricas, lo que lo convierte en un trazador muy útil para el Hg de la atmósfera superior. El MIF de los isótopos pares se reporta para los isótopos <sup>200</sup>Hg y <sup>204</sup>Hg ( $\Delta^{200}\text{Hg}$  y  $\Delta^{204}\text{Hg}$ , respectivamente) por razones de nomenclatura, aunque puede afectar también a los demás (<sup>196</sup>Hg, <sup>198</sup>Hg y <sup>202</sup>Hg).<sup>73</sup>

Los efectos del espín magnético y del volumen nuclear no explican el MIF de los isótopos pares, de tal manera que se han propuesto varios mecanismos, como el efecto de autoblandaje, observado en los isótopos de oxígeno, o la captura de neutrones, para aclararlo.<sup>73</sup> Sin embargo, los mecanismos y los procesos exactos que desencadenan el MIF de los isótopos pares del mercurio siguen sin estar del todo definidos.<sup>74, 75</sup>

---

<sup>73</sup> Cai, H., Chen, J., 2016. Mass-independent fractionation of even mercury isotopes. *Sci. Bull.* 61, 116–124.

<sup>74</sup> Blum, J.D., Johnson, M.W., 2017. Recent developments in mercury stable isotope analysis. *Rev. Mineral. Geochemistry* 82, 733–757.

<sup>75</sup> Yuan, S., Chen, J., Hintelmann, H., Cai, H., Yuan, W., He, S., Zhang, K., Zhang, Y., Liu, Y., 2022. Event-Based Atmospheric Precipitation Uncovers Significant even and Odd Hg Isotope Anomalies Associated with the Circumpolar Vortex. *Environ. Sci. Technol.* 56, 12713–12722.

### A.3.3. Variabilidad isotópica natural de Hg

Las abundancias isotópicas del Hg en las mayores reservas del planeta aún no han sido documentadas correctamente, lo que viene dificultado por las emisiones antropogénicas de Hg a la atmósfera que se extienden globalmente.<sup>74</sup>

Una estimación inicial del fraccionamiento isotópico del Hg puede llevarse a cabo por medio de los diagramas de tres isótopos, en los que se representa un  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  frente al  $\delta^{202}\text{Hg}$ , para observar si los isótopos siguen un fraccionamiento dependiente de la masa, en caso de seguir una recta, o un fraccionamiento independiente de la masa, cuando se desvían de la línea. Así mismo, la manera más usual para la evaluación de la variabilidad isotópica natural del Hg es la representación gráfica del  $\Delta^{199}\text{Hg}$  (MIF) frente al  $\delta^{202}\text{Hg}$  (MDF), que permite revelar diferencias entre los distintos compartimentos ambientales. Tal y como se muestra en la **Figura 10**, la variabilidad que se observa es relativamente pequeña (<10‰) si se compara con la variabilidad de los deltas de isótopos de elementos más ligeros como el  $^{13}\text{C}$ , que puede ser de hasta un 110‰.<sup>76</sup>

---

<sup>76</sup> Tsui, M.T.K., Blum, J.D., Kwon, S.Y., 2020. Review of stable mercury isotopes in ecology and biogeochemistry. *Sci. Total Environ.* 716, 135386.

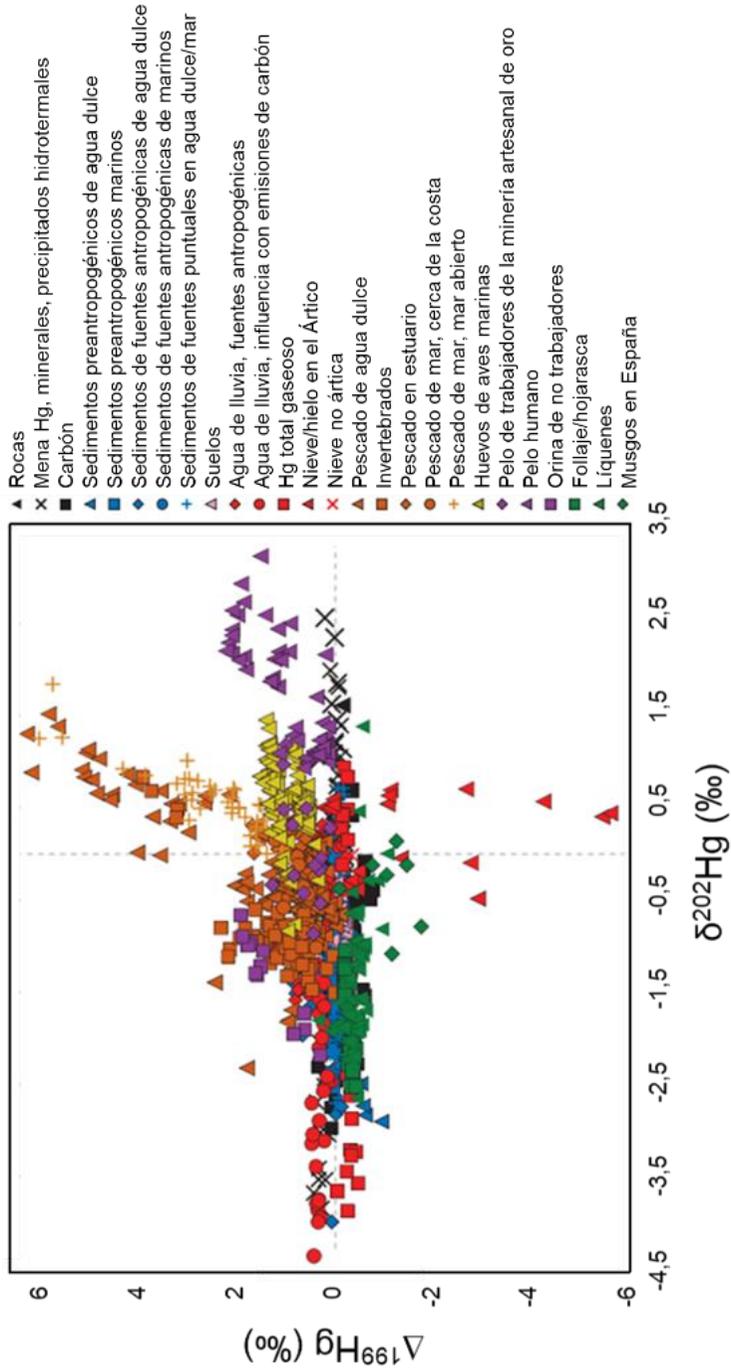


Figura 10. Diagrama  $\Delta^{199}\text{Hg}$  (MIF) frente al  $\delta^{202}\text{Hg}$  (MDF) para diferentes muestras, tomado de Bergquist, B.A. *et al.*<sup>71</sup>

## Introducción

---

Muchas de las conclusiones científicas más importantes se basan en pequeñas variaciones entre muestras en  $\delta^{202}\text{Hg}$  y  $\Delta^{199}\text{Hg}$  (<0,5 ‰), lo que obliga a hacer *zoom* a gráficos como el de la **Figura 10**. Cuando las muestras presentan variaciones en el  $\Delta^{199}\text{Hg}$  de  $\pm 0,30\%$  es entonces oportuno considerar la relación  $\Delta^{199}\text{Hg}/\Delta^{201}\text{Hg}$ , para identificar procesos MIF que por lo general suelen permanecer inalterados.<sup>71</sup>

A modo de control de calidad para los valores de la composición isotópica de Hg se utiliza el estándar de referencia NIST RM 8610 (UM-Almadén), producto de Hg metálico que proviene de la famosa mina de Almadén y cuya composición isotópica es cercana al valor de la mediana del  $\delta^{202}\text{Hg}$  de los grupos representados en la **Figura 10**.<sup>70</sup> Los valores certificados para los deltas de NIST RM-8610 (UM-Almadén) se encuentran recogidos en la **Tabla 4**:

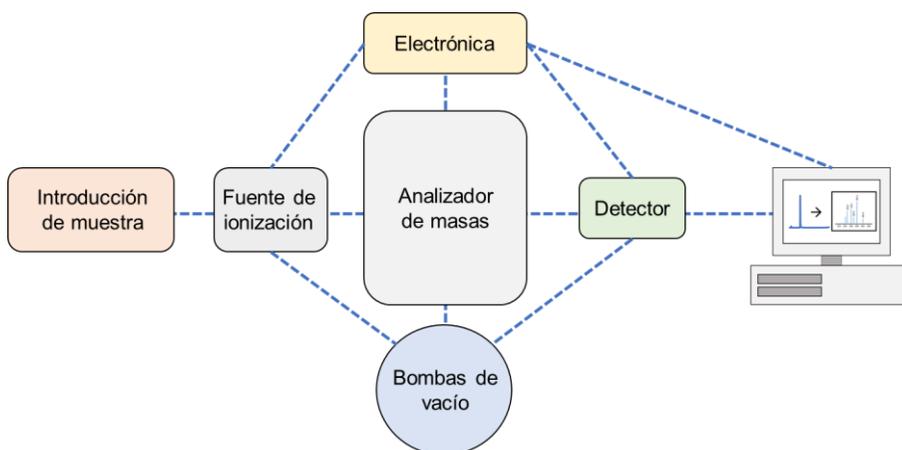
**Tabla 4.** Valores delta de Hg del NIST RM 8610 calculados frente al NIST SRM 3133.

$\delta^{199}\text{Hg}$	$\delta^{200}\text{Hg}$	$\delta^{201}\text{Hg}$	$\delta^{202}\text{Hg}$	$\Delta^{199}\text{Hg}$	$\Delta^{200}\text{Hg}$	$\Delta^{201}\text{Hg}$
-0,17±0,01	-0,27±0,02	-0,46±0,02	-0,56 ±0,03	-0,03±0,02	0,00±0,01	-0,04 ±0,01

## A.4. Medida de las relaciones isotópicas de mercurio por espectrometría de masas

Para la medida de las relaciones isotópicas de Hg, tanto para la cuantificación de la concentración de las diferentes especies, como para la determinación de su composición isotópica, es necesaria una técnica lo suficientemente sensible, precisa y versátil, características que se adaptan en su totalidad a la espectrometría de masas (MS).<sup>77</sup>

La espectrometría de masas nace de la mano de J. J. Thomson, hace ya más de un siglo<sup>78</sup>, y se basa en la medida de las relaciones de masa-carga ( $m/z$ ) de los iones generados a partir de las moléculas o los átomos de analito, para lo que se hace uso de un equipo con unos componentes como los que se muestra en la **Figura 11**.<sup>79</sup>



**Figura 11.** Esquema de los componentes básicos de un espectrómetro de masas adaptado de Dass, C. *et al.*<sup>79</sup>

<sup>77</sup> Dass, C., 2007. *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. John Wiley & Sons.

<sup>78</sup> Griffiths, I. W., 1997. JJ Thomson—the centenary of his discovery of the electron and of his invention of mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 11(1), 2-16.

<sup>79</sup> Dass, C., & Brodbelt, J. S., 2001. Principles and practice of biological mass spectrometry. *Applied Spectroscopy*, 55(9), 296A-297A.

El sistema de introducción de muestra permite la transferencia de los analitos, manteniendo su total integridad, a la fuente de ionización, que los convierte en iones en fase gas. Son varios los tipos de fuentes de ionización disponibles y su elección suele recaer en la naturaleza de la muestra que se quiere analizar, pudiendo aplicarse a especies atómicas, como el plasma de acoplamiento inductivo (ICP) o moleculares, como la ionización electrónica (EI).

En el analizador de masas los iones son separados de acuerdo con su relación masa-carga ( $m/z$ ). Los analizadores de uso más común son los de tipo cuadrupolo, sector magnético y tiempo de vuelo, aunque existen también otros tipos de uso bastante corriente, cuyas diferencias principales se encuentran en la resolución ( $M/\Delta M$ ), los tiempos de barrido, el rango de masas, la transmisión y la precisión.<sup>80</sup> Con el fin de eliminar interferencias espectrales y mejorar la relación señal/ruido algunos equipos incluyen una celda de colisión, que si se combina con dos analizadores de masa da lugar a un espectrómetro de masas en tándem.<sup>54</sup>

Una vez que los iones llegan al detector, son medidos y amplificados, generalmente por multiplicadores de electrones secundarios (SEM) o copas de Faraday. Respecto al sistema de vacío, la mayoría de los equipos cuentan con sistemas de bombas que permiten alcanzar valores sobre los  $10^{-8}$  torr en la región del analizador de masas.<sup>77</sup>

### A.4.1. Sistemas de introducción de muestra

Atendiendo a si las muestras se encuentran en estado líquido, sólido o gaseoso, existen diversos procedimientos de introducción, que son más o menos adecuados según la fuente de ionización que utilice el espectrómetro de masas.

---

<sup>80</sup> Skoog, D., West, D., Holler, F., and Crouch, S., 2004. Fundamentos de química analítica (Octava Edición Ed.). Madrid, España: Ediciones Thomson.

En los equipos de ICP-MS, la nebulización convencional es la manera de introducción de muestra más extendida para el análisis elemental.<sup>81</sup> Cuando lo que se busca es la determinación de especies es necesario además el acoplamiento de sistemas cromatográficos que permitan su separación, a no ser que estas hayan sido aisladas previamente aplicando procedimientos *off-line*.<sup>82</sup> Los equipos comerciales de EI-MS suelen ir acoplados a sistemas cromatográficos directamente.

Para el caso concreto del mercurio existen otro tipo de sistemas de introducción de muestra algo menos habituales, como las trampas de oro o sistemas de generación de vapor frío, que facilitan la preconcentración y la separación del elemento de la matriz de la muestra.<sup>83, 84</sup>

### A.4.1.1. Nebulización convencional

Como ya se comentaba, la nebulización convencional es la manera más básica de introducción de muestra en estado líquido a un espectrómetro de masas de tipo ICP.

El sistema estándar de inserción de muestra está formado por un nebulizador de tipo neumático, gracias al cual se genera el aerosol, que es introducido al plasma, y una cámara de nebulización, que evita que las gotas de mayor tamaño alcancen la fuente de ionización. Normalmente, las muestras son arrastradas al

---

<sup>81</sup> Vanhaecke, F., and Degryse, P., 2012. *Isotopic analysis: fundamentals and applications using ICP-MS*. John Wiley & Sons.

<sup>82</sup> Yang, L., 2009. Accurate and precise determination of isotopic ratios by MC-ICP-MS: A review. *Mass spectrometry reviews*, 28(6), 990-1011.

<sup>83</sup> Evans, R. D., Hintelmann, H., & Dillon, P. J., 2001. Measurement of high precision isotope ratios for mercury from coals using transient signals. Presented at the 2001 European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, Lillehammer, Norway, February 4-8, 2001. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16(9), 1064-1069.

<sup>84</sup> Foucher, D., and Hintelmann, H., 2006. High-precision measurement of mercury isotope ratios in sediments using cold-vapor generation multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384, 1470-1478.

nebulizador por medio de bombas peristálticas, aunque existen nebulizadores, como los micronebulizadores, que autoaspiran la disolución, evitando así los característicos y molestos pulsos que provocan derivas en la señal.<sup>81</sup>

En el pasado, algunos autores llegaron a utilizar la nebulización convencional para la determinación de Hg, sin embargo, este sistema de introducción de muestra va acompañado de fuertes efectos de memoria para este elemento en particular.<sup>85</sup>

### A.4.1.2. Cromatografía de líquidos

Son varias las técnicas cromatográficas que se pueden utilizar para separar las especies de Hg e introducirlas en un espectrómetro de masas, como la cromatografía de líquidos (LC).

Un cromatógrafo de líquidos ya sea de alta eficacia (HPLC), de cromatografía iónica (IC), de cromatografía multijeringa (MSC), requiere de una columna cromatográfica y de una o varias fases móviles, que permitan la separación de las especies y que sean compatibles con el tipo de detector a emplear.

La mayor parte de estudios de especiación de Hg con LC han sido realizados con HPLC, cuya principal ventaja es la evasión del paso de derivatización, necesario en la cromatografía de gases (GC). Las columnas con fase estacionaria hidrofóbica C18 y C8 son las columnas más utilizadas para la determinación de las especies de mercurio por medio de HPLC en fase reversa.<sup>86</sup>

---

<sup>85</sup> Clevenger, W.L., Smith, B.W., Winefordner, J.D., 1997. Critical Reviews in Analytical Chemistry Trace Determination of Mercury: A Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 27, 1–26.

<sup>86</sup> Amde, M., Yin, Y., Zhang, D., Liu, J., 2016. Methods and recent advances in speciation analysis of mercury chemical species in environmental samples: A review. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 28, 51–65.

### A.4.1.3. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases es también muy efectiva a la hora de separar especies químicas. Este tipo de cromatografía requiere igualmente de una columna cromatográfica, pero a diferencia de la LC, utiliza un gas inerte para transportar los analitos, que son separados por puntos de ebullición. Un requisito indispensable para poder hacer uso de la GC es que los analitos sean volátiles o que puedan convertirse en compuestos volátiles por medio de una derivatización. Los procedimientos comunes de derivatización para las especies de Hg son la etilación, la propilación y la fenilación en fase acuosa.<sup>86</sup>

La cromatografía de gases puede acoplarse a los diferentes equipos de espectrometría de masas destacando, por haberse empleado en este trabajo, su acoplamiento a EI-MS y a ICP-MS.

La interfase más habitual para el acoplamiento de la GC a los equipos con fuente de ionización electrónica consiste en un tubo metálico, equipado con un controlador de temperatura, aunque existen otros diseños cuyo uso depende de la aplicación y del fabricante.<sup>87</sup>

En el caso del acoplamiento de la GC con los equipos con fuente de plasma de acoplamiento inductivo los diseños de la interfase están menos estandarizados y existen dos configuraciones básicas que dan lugar a condiciones de plasma seco y húmedo, respectivamente.<sup>88</sup> Una de las posibles interfases destaca frente a las demás por su facilidad de colocación, sencillez y coste.<sup>89</sup> Esta interfase consiste en un bloque metálico calentado y un tubo de PFA, a través del cual las especies son

---

<sup>87</sup> Ten Noever de Brauw, M.C., 1979. Combined gas chromatography-mass spectrometry: A powerful tool in analytical chemistry. *J. Chromatogr. A* 165, 207–233.

<sup>88</sup> Bouyssiere, B., Szpunar, J., Lobinski, R., 2002. Gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection in speciation analysis. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 57, 805–828.

<sup>89</sup> Bayón, M.M., Cambor, M.G., Ignacio, J., Alonso, G., Sanz-Medel, A., 1999. An alternative GC-ICP-MS interface design for trace element speciation. *J. Anal. At. Spectrom.* 14, 1317–1322.

arrastradas al ICP por medio de Ar que procede directamente del espectrómetro de masas. Cuando el tubo de PFA es conectado de manera inmediata a la antorcha, se generan las condiciones de plasma seco que se mencionaban y que resultan ser más sensibles y presentar menos interferencias que las condiciones de plasma húmedo. Si la línea de transferencia de la interfase se conecta a una cámara de nebulización, se generan las condiciones de plasma húmedo. Estas condiciones húmedas no solo permiten evitar el acúmulo de depósitos de carbonilla en los conos por la mala combustión de los disolventes orgánicos<sup>90</sup>, sino que también posibilitan la introducción de elementos para la corrección del fenómeno de la discriminación de masa<sup>91</sup>, que será explicado en el apartado posterior (sección **A.4.5.3.**).

### A.4.1.3.1. Introducción de muestra en el cromatógrafo de gases

Cuando la muestra se introduce al cromatógrafo de gases, los componentes de la mezcla deben entrar en la columna formando una fina banda, ya que serán separados a lo largo de esta en forma de picos lo más estrecho posibles.

La mayor parte de las muestras que se analizan por medio de GC contienen los analitos de interés en un disolvente purificado, por lo que son introducidas al inyector del cromatógrafo de gases por medio de una jeringa.<sup>92</sup> Existen varios tipos de inyectores, como los inyectores *split/splitless* y los inyectores de

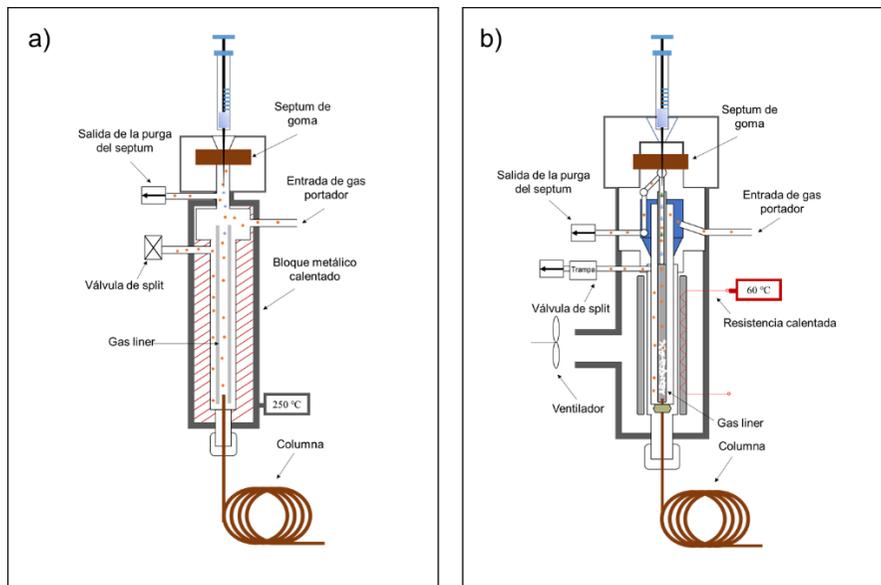
---

<sup>90</sup> Tao, H., Nakazato, T., Akasaka, M., Rajendran, R. B., Elouali, S., 2008. Plasma gas-switching method for gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry and determination of polybrominated diphenylethers with high precision and sensitivity. *Analytical Sciences*, 24(12), 1529-1536.

<sup>91</sup> Krupp, E. M., Pécheyran, C., Meffan-Main, S., Donard, O. F., 2001. Precise isotope-ratio measurements of lead species by capillary gas chromatography hyphenated to hexapole Multicollector ICP-MS. *Fresenius journal of analytical chemistry*, 370, 573-580.

<sup>92</sup> Sparkman, O. D., Penton, Z., Kitson, F. G., 2011. *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. Academic press.

temperatura programada (PTV), cuyos esquemas pueden observarse en la **Figura 12**.



**Figura 12.** Inyectores de cromatografía de gases. a) Sección transversal de un inyector *split/splitless*. b) Sección transversal de un inyector de alto volumen (PTV).

El inyector *split/splitless* es el más común y puede operar en dos modos, como su nombre indica. El modo *split*, con división de flujo, se utiliza cuando las muestras son altamente concentradas, de tal manera que parte es venteadada por la válvula de *split*. El modo *splitless*, sin división de flujo, se utiliza cuando las muestras son diluidas. Durante la inyección la válvula de *split* se mantiene cerrada y una vez que los analitos son focalizados en cabeza de columna dicha válvula se abre para purgar así el exceso de disolvente. En este tipo de inyectores se suelen introducir volúmenes de muestra de entre 1 y 2  $\mu\text{L}$  y se encuentran a una alta temperatura constante que permite la vaporización del disolvente y de los analitos.

El inyector de temperatura programada es un inyector con múltiples modalidades, ya que permite operar como inyector *split/splitless* convencional,

como *split/splitless* en frío o incluso como inyector de altos volúmenes. El modo *split/splitless* en frío se usa cuando los analitos tienen una amplia gama de puntos de ebullición. La muestra es introducida a una baja temperatura, que va aumentando hasta que todos los compuestos de interés son focalizados en cabeza de columna. Cuando en el inyector PTV se introducen volúmenes de entre 5 y 100  $\mu\text{L}$  entra entonces en escena la modalidad de altos volúmenes, la cual es básicamente una modificación del modo *split/splitless* en frío. En este modo los analitos deben tener puntos de ebullición muy superiores al disolvente para poder quedar retenidos en el *liner* (que generalmente contiene lana de vidrio) mientras se ventea el disolvente.<sup>92, 93</sup>

#### A.4.1.4. Generación de vapor frío

La generación de vapor frío (CVG) se puede utilizar acoplada a diferentes equipos de espectrometría, como los de absorción atómica (AAS) o de fluorescencia (AFS).<sup>94</sup> Al igual que ocurre con la cromatografía de gases, cuando se acopla a equipos de plasma de acoplamiento inductivo puede presentar dos configuraciones, que dan lugar a condiciones de plasma húmedo y seco.

Este sistema de introducción de muestra es el preferido para la medida de las relaciones isotópicas de Hg a bajas concentraciones<sup>95</sup> y se basa en el uso de un separador gas-líquido, como el de la imagen de la **Figura 13**, que permite la

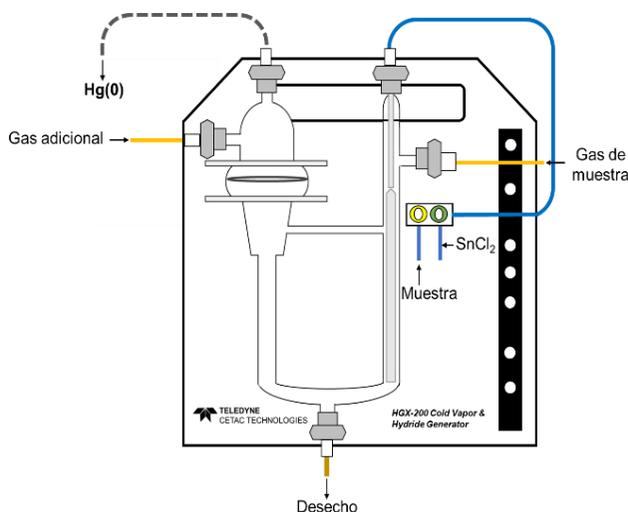
---

<sup>93</sup> Hoh, E., Mastovska, K., 2008. Large volume injection techniques in capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1186(1-2), 2-15.

<sup>94</sup> Pohl, P., Greda, K., Dzimitrowicz, A., Welna, M., Szymczycha-madeja, A., Lesniewicz, A., Jamroz, P., 2019. Trends in Analytical Chemistry Cold atmospheric plasma-induced chemical vapor generation in trace element analysis by spectrometric methods. *Trends Anal. Chem.* 113, 234–245.

<sup>95</sup> Rua-Ibarz, A., Bolea-Fernandez, E., & Vanhaecke, F., 2016. An in-depth evaluation of accuracy and precision in Hg isotopic analysis via pneumatic nebulization and cold vapor generation multi-collector ICP-mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408, 417–429.

producción de Hg vapor a partir de la reacción de  $\text{Hg}^{2+}$  con dicloruro de estaño ( $\text{SnCl}_2$ ).<sup>96</sup>



**Figura 13.** Generador de vapor frío.

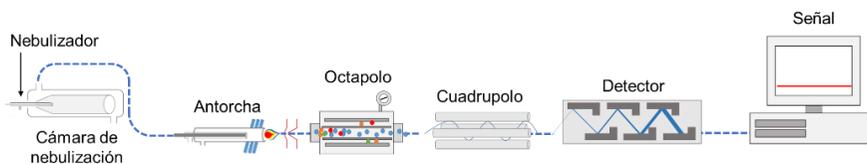
### A.4.2. ICP-MS de tipo cuadrupolo (Q-ICP-MS)

Los equipos de ICP-MS de tipo cuadrupolo son los más habituales, debido al relativo bajo coste y a la robustez de su analizador, que a pesar de tener una resolución limitada ( $300\text{-}400 \text{ M}/\Delta\text{M}$ ), es suficiente cuando no hay interferencias espectrales.<sup>97</sup>

En la **Figura 14** se puede observar un esquema de un equipo ICP-MS de tipo cuadrupolo, que cuenta además con una celda de colisión en forma de octapolo, la cual puede operar con He o  $\text{H}_2$  para mejorar la precisión eliminando interferencias poliatómicas.

<sup>96</sup> Wu, L., Zheng, C., Ma, Q., Hu, C., Hou, X., 2007. Chemical vapor generation for determination of mercury by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Applied spectroscopy reviews*, 42(2), 79-102.

<sup>97</sup> Thomas, R., 2008. *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners*. CRC press.



**Figura 14.** Esquema de un equipo ICP-MS de tipo cuadrupolo.

A modo de detector, los Q-ICP-MS suelen utilizar multiplicadores de iones secundarios (SEM). Se trata de dínodos que puede funcionar en forma análoga o digital, dependiendo del número de iones que los alcanzan.

### A.4.3. ICP-MS de tipo multicolector (MC-ICP-MS)

Los equipos de ICP-MS de tipo multicolector se utilizan para la medida exacta y precisa de relaciones isotópicas, habiendo desbancado a los equipos de espectrometría de masas de ionización térmica (TIMS), por su eficacia en la ionización y las facilidades en la preparación de muestra.<sup>98</sup>

Este tipo de instrumentos cuentan con un analizador de masas de doble enfoque, que resulta de una combinación de un analizador de masas de sector electroestático y uno de sector magnético, en configuración Nier-Johnson directa, como se observa en el esquema de la **Figura 15**. El sector electroestático filtra los iones en función de sus energías, mientras que el sector magnético los dispersa en función de su relación masa-carga. Esto permite que los iones sean detectados simultáneamente si a la salida del sector magnético se coloca una línea de detectores, la cual consiste generalmente en un conjunto de copas de Faraday.

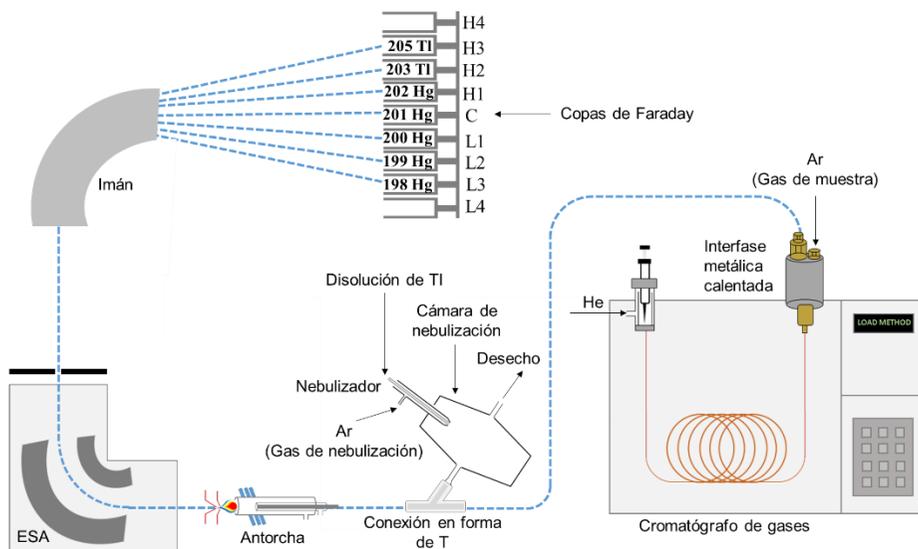
Generalmente, los equipos MC-ICP-MS como el de la **Figura 15** poseen nueve copas de Faraday, una copa central fija y ocho copas móviles, conformadas por

---

<sup>98</sup> Walczyk, T., 2004. TIMS versus multicollector-ICP-MS: Coexistence or struggle for survival? *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 229–231.

## Medida de las relaciones isotópicas de mercurio por espectrometría de masas

electrodos de grafito conectados a una toma tierra a través de una resistencia. Cuando los iones colisionan con las copas son neutralizados, generándose una corriente a través de la resistencia, la cual es amplificada. Las copas de Faraday son detectores muy precisos, ideales para la medida de relaciones isotópicas de (valga la redundancia) alta precisión, por ser independientes a la masa, energía y velocidad de los iones, pero presentan baja sensibilidad y tiempos de respuesta lentos.<sup>99</sup>



**Figura 15.** Esquema de un equipo MC-ICP-MS acoplado a un cromatógrafo de gases en configuración de plasma húmedo.

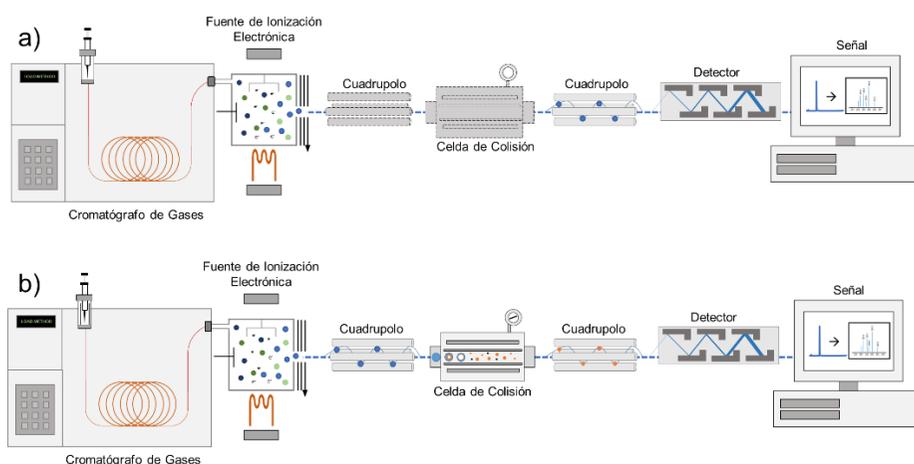
Para mejorar de la sensibilidad, algunos equipos de tipo multicoleccionador emplean interfaces de alta eficacia, como la 'Jet interface', amplificadores de

<sup>99</sup> De Hoffmann, E., Stroobant, V., 2007. Mass spectrometry: principles and applications. John Wiley & Sons.

mayor ganancia, como los amplificadores de  $10^{13} \Omega$  en lugar de los de  $10^{11} \Omega$  tradicionales, o sistemas de desolvatación.<sup>100, 101, 102</sup>

### A.4.4. EI-MS/MS

Como ya se mencionaba, los equipos de espectrometría de masas de ionización electrónica suelen ir acoplados directamente a sistemas cromatográficos lo que, en el contexto de la presente tesis doctoral, llevó a utilizar un equipo EI-MS/MS acoplado a un cromatógrafo de gases, como el que se observa en la **Figura 16**.



**Figura 16.** Espectrómetro de masas con fuente de ionización electrónica de triple cuadrupolo acoplado a un cromatógrafo de gases con a) el primer cuadrupolo y la celda de colisión apagados (modo SIM) y b) con el primer cuadrupolo y la celda de colisión encendidos (modo MRM).

<sup>100</sup> Breton, T., Lloyd, N.S., Trinquier, A., Bouman, C., Schwieters, J.B., 2015. Improving Precision and Signal/Noise Ratios for MC-ICP-MS. *Procedia Earth Planet. Sci.* 13, 240–243.

<sup>101</sup> Grigoryan, R., Costas-Rodríguez, M., Santens, P., Vanhaecke, F., 2020. Multicollector Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry with  $10^{13} \Omega$  Faraday Cup Amplifiers for Ultrasensitive Mg Isotopic Analysis of Cerebrospinal Fluid Microsamples. *Anal. Chem.* 92, 15975–15981.

<sup>102</sup> Ma, Q., Yang, M., Zhao, H., Evans, N.J., Chu, Z.Y., Xie, L.W., Huang, C., Zhao, Z.D., Yang, Y.H., 2019. Accurate and precise determination of Lu and Hf contents and Hf isotopic composition at the sub-nanogram level in geological samples using MC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 34, 1256–1262.

La fuente de ionización de este tipo de equipos suele operar a 70eV, permitiendo una ionización y una fragmentación de las moléculas reproducible, que facilita la existencia de bibliotecas universales. Al tratarse de equipos de masas en tándem pueden operar, además de en los diversos modos de adquisición que permite la presencia de los dos analizadores de masa, en modo escaneo (SCAN) y en modo de control de iones seleccionados (SIM).<sup>103</sup>

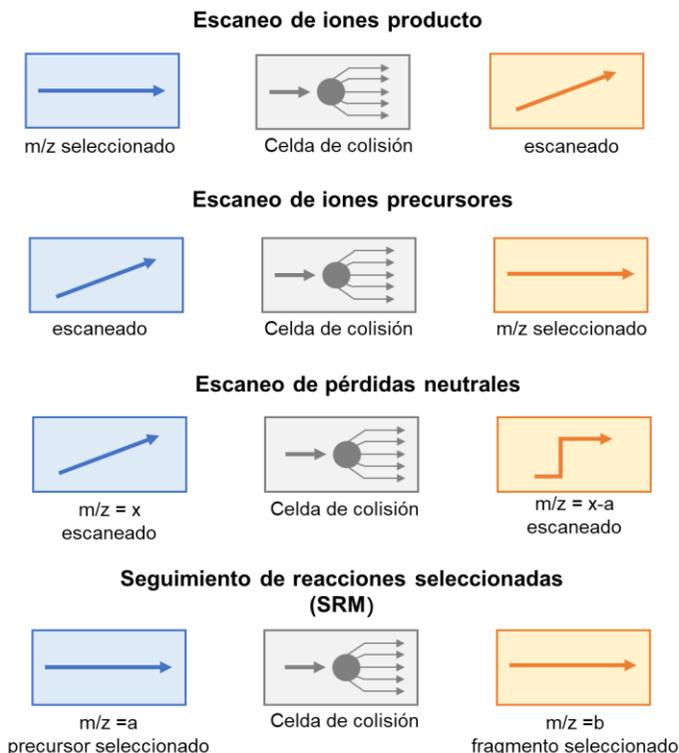
El modo SCAN es útil para la identificación de los componentes de una mezcla, debido a que se realiza un barrido de todas las masas del espectro, haciéndose uso únicamente de un cuadrupolo y manteniendo la celda de colisión apagada, como en la **Figura 16 a)**.

El modo SIM es útil para la cuantificación de los componentes de una mezcla. En este caso, se mejoran la sensibilidad y la selectividad con respecto al modo SCAN, pues únicamente ciertos valores  $m/z$  son registrados. La celda de colisión y el primer cuadrupolo están, al igual que para el modo SCAN, apagados.

Cuando se hace uso de la celda de colisión y de los dos cuadrupolos (**Figura 16 b)**) pueden plantearse diferentes escenarios, como el escaneo de iones producto, el escaneo de iones precursores, el escaneo de pérdidas neutrales y el seguimiento de reacciones seleccionadas (SRM), en función de la actuación de los cuadrupolos, como puede observarse en la **Figura 17**. Si el seguimiento de reacciones seleccionadas (SRM) se aplica a múltiples iones producto, provenientes de uno o varios iones precursores, se le conoce como seguimiento de reacciones múltiples (MRM). Este modo proporciona una alta selectividad y límites de detección muy buenos, que permiten la cuantificación/detección de analitos con propiedades de fragmentación conocidas en muestras complejas.

---

<sup>103</sup> Gross, J. H., 2006. Mass spectrometry: a textbook. Springer Science & Business Media.



**Figura 17.** Esquema de los principales procesos en espectrometría de masas en tándem adaptado de E.Hoffmann .<sup>104</sup>

#### A.4.5. Factores que afectan a la exactitud de la medida de las relaciones isotópicas

Existen varios efectos que provocan cambios en la composición isotópica medida por medio de los equipos con fuente de plasma de acoplamiento inductivo y que es necesario tener en cuenta: la contaminación de los reactivos (blancos), las interferencias espectrales, los efectos de la discriminación de masa y la no linealidad del detector.<sup>54</sup>

<sup>104</sup> De Hoffmann, E., 1996. Tandem mass spectrometry: A primer. J. Mass Spectrom. 31, 129–137.

### A.4.5.1. Blancos

Los reactivos o el material de laboratorio pueden ser fuentes de contaminación, por lo que para sustraer su contribución es necesario medir un blanco de procedimiento al principio o durante la jornada de medida.

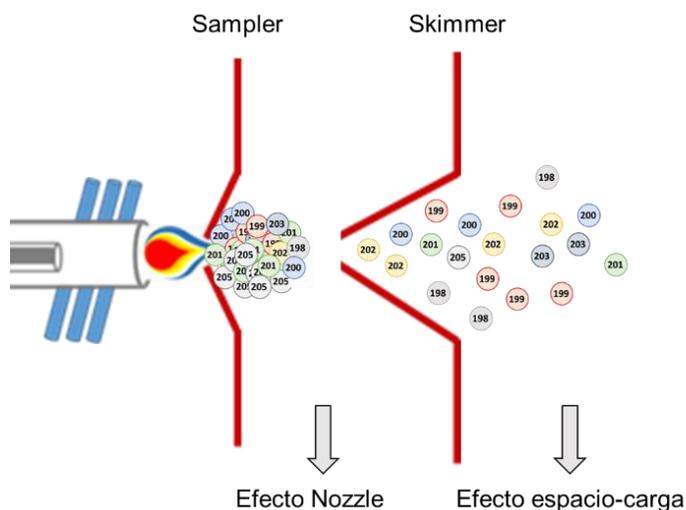
En el caso particular de las señales transientes, obtenidas cuando una técnica de separación es acoplada al espectrómetro de masas, puede eliminarse fácilmente la contribución de la señal de fondo, sin embargo, la contaminación procedente de los reactivos o del material no puede sustraerse.

### A.4.5.2. Interferencias espectrales

Las interferencias espectrales pueden ser isobáricas, cuando un elemento posee un isótopo con la misma masa nominal que el analito, como el  $^{204}\text{Hg}$  y el  $^{204}\text{Pb}$ , o poliatómicas, cuando se forman por la combinación de dos o más elementos en la fuente de ionización. Algunas interferencias isobáricas pueden corregirse matemáticamente, mientras que otras deben ser aisladas químicamente. Para la eliminación de interferencias isobáricas se pueden emplear diferentes estrategias, como el uso de celdas de colisión, analizadores de alta resolución y espectrometría de masas en tándem.

### A.4.5.3. Discriminación de masa

Una de las partes críticas de los equipos de plasma de acoplamiento inductivo es la interfase de extracción, pues pone en contacto la fuente de ionización, a presión atmosférica, con el espectrómetro de masas, a alto vacío. Para asegurar la entrada de los iones al espectrómetro, dos conos (*sampler* y *skimmer*), generalmente de níquel, se colocan tras el plasma. Es en esta región donde se produce una transmisión preferencial de los iones pesados frente a los ligeros, lo que se conoce como la discriminación de masa, fenómeno ilustrado en la **Figura 18**.



**Figura 18.** Descripción del efecto de la discriminación de masa en un espectrómetro de masas.

Este fenómeno es causado por dos efectos físicos, el efecto *Nozzle* y el efecto espacio-carga. El efecto *Nozzle* tiene lugar entre ambos conos y consiste en una expansión supersónica de los iones. El efecto espacio-carga tiene lugar tras el *skimmer*, donde se forma una nube positiva de iones que se repelen entre sí. Ambos efectos provocan un enriquecimiento en iones pesados del haz, lo que tiene como resultado una desviación de las relaciones isotópicas reales.<sup>81</sup>

La discriminación de masas no es constante a lo largo de la sesión de medida y es dependiente de los efectos de matriz o de la concentración de las muestras. Esto obliga en muchos casos a separar los analitos de la matriz y a ajustar cuidadosamente las señales de los patrones y las muestras.

Para la corrección de este fenómeno pueden utilizarse diferentes métodos de calibración externos, como el *bracketing* muestra-patrón (SSB), internos, basados en la medida de la relación isotópica de un patrón añadido previamente a la muestra o una combinación de ambos.<sup>82</sup> Los factores de corrección se obtienen a

partir de una serie de modelos matemáticos, siendo los modelos exponencial y la ley de Russel las ecuaciones más populares.<sup>54</sup>

### A.4.5.4. No linealidad del detector

Los detectores secuenciales, como los SEM, pierden la linealidad a altas frecuencias de conteo, debido al tiempo que requieren para registrar y contar cada ion que los alcanza. Este tiempo se conoce como 'tiempo muerto del detector' y dura unos pocos nanosegundos, durante los cuales, si otro ion llega al detector, no será registrado. El tiempo muerto del detector ( $\tau$ (s)) puede corregirse mediante la siguiente ecuación:

$$I_{\text{cor}} = \frac{I_{\text{exp}}}{1 - I_{\text{ext}}\tau} \quad (16)$$

donde  $I_{\text{cor}}$  e  $I_{\text{exp}}$  son las intensidades corregida y experimental, respectivamente.

La mayor parte de los equipos modernos corrigen el tiempo muerto del detector por defecto, aunque para algunas aplicaciones se recomienda comprobar y actualizar el valor regularmente.<sup>54</sup>

Como las copas de Faraday son detectores analógicos, no sufren el efecto del tiempo muerto del detector. Sin embargo, poseen diferentes eficiencias de rendimiento, que deben corregirse periódicamente estableciendo un factor de ganancia. Además, los amplificadores de las copas de Faraday pueden presentar cierto desfase temporal, acusado para la medida de señales transientes, que debe también rectificarse.<sup>105</sup>

---

<sup>105</sup> Queipo-Abad, S., Rodríguez-González, P., García Alonso, J.I., 2019. Measurement of compound-specific Hg isotopic composition in narrow transient signals by gas chromatography coupled to multicollector ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 34, 753–763.

### A.4.6. Factores que afectan a la precisión de la medida de las relaciones isotópicas

Existen varias causas que provocan una dispersión de los resultados y que, al igual que los factores que afectan a la exactitud, es necesario tener en cuenta: la estabilidad del haz de iones, la estadística del conteo de iones, el perfil de los picos isotópicos y el perfil de la señal analítica.

#### A.4.6.1. Estabilidad del haz de iones

El sistema de introducción de muestra y el plasma provocan, al no ser estables, fluctuaciones que afectan al haz iónico. Estas fluctuaciones pueden reducirse utilizando, por ejemplo, sistemas de autoaspiración o muestras con un menor contenido en sales o disolventes orgánicos. Los equipos de tipo multicolector se ven menos afectados por dichas fluctuaciones al medir simultáneamente varios isótopos del mismo elemento.

#### A.4.6.2. Estadística del conteo de iones

Cuando se utilizan equipos con detectores SEM, la precisión de la medida de las relaciones isotópicas se ve afectada por la estadística del conteo de iones. Esta precisión es proporcional a la raíz de la inversa del número total de cuentas medidas, lo que se traduce en una reducción de la incertidumbre al aumentar la señal. Utilizándose equipos de elevada sensibilidad o altas concentraciones de analito puede reducirse la incertidumbre asociada a la medida.<sup>81</sup> Los equipos multicolectores que utilizan copas de Faraday también se ven afectados por la estadística de conteo de iones, aunque su contribución suele ser despreciable al

trabajar en modo analógico (1 voltio de medida analógica se corresponde aproximadamente con  $10^{10}$  iones/s).<sup>106,107</sup>

### A.4.6.3. Perfil de los picos isotópicos

La forma de los picos isotópicos depende del tipo de espectrómetro de masas utilizado. Si se emplean equipos de tipo cuadrupolo, los picos se obtienen en forma triangular, lo que obliga a realizar las medidas en el máximo. Cuando se usan equipos con un analizador de masas de doble enfoque en baja resolución se obtienen picos trapezoidales, que pasan a ser triangulares si la resolución aumenta a media o alta.

Pequeños cambios en el eje  $m/z$  durante la adquisición afectarán gravemente a las medidas realizadas con Q-ICP-MS, mientras que los equipos de doble enfoque no se verán afectados, siempre y cuando, se mantengan en baja resolución. Los equipos multicolectores permiten un trabajo con picos trapezoidales, por lo que la estabilidad de la masa no afecta significativamente a la precisión de las relaciones isotópicas

### A.4.6.4. Perfil de la señal analítica

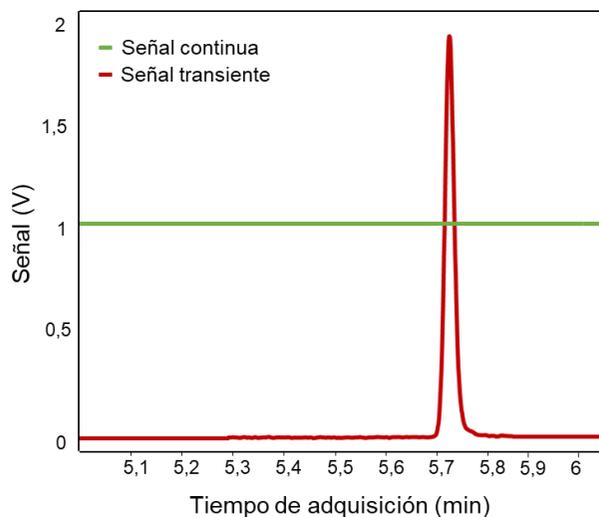
Las relaciones isotópicas resultado de señales transientes, obtenidas cuando se acopla al espectrómetro de masas un sistema de separación cromatográfico, son mucho menos precisas que las que se consiguen a partir de señales continuas y constantes. En este tipo de señales, que varían con el tiempo, como la de la **Figura 19**, es necesario realizar un buen ajuste del tiempo de integración en

---

<sup>106</sup> Penanes, P. A., Galán, A. R., Huelga-Suarez, G., Rodríguez-Castrillón, J. Á., Moldovan, M., Alonso, J. I. G., 2022. Isotopic measurements using ICP-MS: A tutorial review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 37(4), 701-726.

<sup>107</sup> San Blas, O. G., Gayón, J. M. M., Alonso, J. I. G., 2015. Evaluation of multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICP-MS) for sulfur metabolic studies using  $^{34}\text{S}$ -labelled yeast. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30(8), 1764-1773.

función de los isótopos que se quiere monitorizar y de la duración de la señal para que obtener el perfil de la señal analítica adecuado.



**Figura 19.** Comparación entre una señal continua (obtenida por CVG) y una señal transiente (obtenida por GC).

En esta tesis doctoral se ha trabajado principalmente con señales transientes, tras el acoplamiento de la cromatografía de gases a ICP-MS y a EI-MS/MS, por lo que este efecto se abordará en profundidad en la discusión de los resultados.





## **B. OBJETIVOS**

---



---

## B.1. Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la **especiación y el fraccionamiento isotópico de Hg en muestras biológicas**. Este objetivo general se abordó a través de varios objetivos parciales, los cuales componen los cinco capítulos en los que se divide la sección de resultados.

### B.1.1. Objetivo I

**Comparación de GC-ICP-MS, GC-EI-MS y GC-EI-MS/MS para la determinación de metilmercurio, etilmercurio y mercurio inorgánico en muestras biológicas por dilución isotópica con trazador triple.** En concreto, se analizarán varios materiales de referencia biológicos (DOLT-4, IAEA-085, IAEA-086 y SRM-955c) por medio de las tres técnicas mencionadas y IDMS con triple trazador para comparar su exactitud, precisión, límites de detección y tolerancia a la matriz.

### B.1.2. Objetivo II

**Determinación de metilmercurio, mercurio inorgánico y mercurio total en muestras de pelo humano por dilución isotópica y GC-ICP-MS.** Concretamente, se analizarán muestras de cabello de población autóctona de Colombia de zonas afectadas por la minería artesanal de oro y un material de referencia de pelo humano proporcionado por el Instituto Nacional de Estudios Ambientales (NIES) de Japón.

### B.1.3. Objetivo III

**Comparación de diferentes procedimientos de corrección del fenómeno de la discriminación de masas para la medida de la composición isotópica específica de las especies de mercurio por cromatografía de gases acoplada a ICP-MS de tipo multicolector.** Específicamente, se analizarán en varias

sesiones de medida los estándares de referencia primario y secundario (NIST SRM-3133 y NIST RM-8610, respectivamente) mediante GC-MC-ICP-MS y los datos se corregirán aplicando dos modelos de corrección interna (Russell y Baxter) y dos procedimientos de corrección externa (SSB y el modelo de Baxter).

### B.1.4. Objetivo IV

**Determinación de las relaciones isotópicas de mercurio inorgánico por medio de GC-MC-ICP-MS utilizando un doble trazador de  $^{199}\text{Hg(II)}$  y  $^{201}\text{Hg(II)}$  para la corrección interna de la discriminación de masas.** En particular, se caracterizará una disolución de doble trazador y se analizarán en varias sesiones de medida los estándares de referencia primario y secundario (NIST SRM-3133 y NIST RM-8610, respectivamente) mediante GC-MC-ICP-MS, aplicando diversos modos de inyección en el GC (*Hot Splitless*, *Cold Splitless* y PTV) y condiciones de plasma húmedo y seco. Los datos se corregirán aplicando dos métodos de corrección interna (TI y DS) y un procedimiento de corrección externa (SSB).

### B.1.5. Objetivo V

**Ampliación del rango de aplicación del análisis isotópico de Hg utilizando CVG-MC-ICP-MS hasta concentraciones sub- $\mu\text{g L}^{-1}$  mediante amplificadores de copas Faraday de  $10^{13}$  ohmios.** Más concretamente, se analizará en varias sesiones de medida el estándar secundario *in-house* mediante CVG-MC-ICP-MS, con dos configuraciones de conos (estándar y *jet*), dos condiciones de plasma (seco y húmedo) y tres configuraciones de amplificadores diferentes (combinando los amplificadores tradicionales de  $10^{11}$  Ohmios con los de  $10^{13}$  Ohmios). Se determinará también la composición isotópica del mercurio de muestras de agua reales recolectadas en Jove (Gijón).

---

## B.2. Objectives

The main objective of this Doctoral Thesis is the **speciation and isotopic fractionation of mercury in biological samples**. This general objective was addressed through a number of sub-objectives, which comprise the five chapters of the results section.

### B.2.1. Objective I

**Comparison of GC-ICP-MS, GC-EI-MS and GC-EI-MS/MS for the determination of methylmercury, ethylmercury and inorganic mercury in biological samples by triple spike species-specific isotope dilution mass spectrometry.** Specifically, several biological reference materials (DOLT-4, IAEA-085, IAEA-086 and SRM-955c) will be analysed by the three techniques mentioned above and triple-spike IDMS to compare accuracy, precision, detection limits and matrix tolerance.

### B.2.2. Objective II

**Determination of methylmercury, inorganic mercury and total mercury in human hair samples by double spiking isotope dilution and GC-ICP-MS.** In particular, hair samples from indigenous Colombian people from areas affected by artisanal gold mining and a human hair reference material provided by the National Institute for Environmental Studies (NIES) in Japan will be analysed.

### B.2.3. Objective III

**Comparison of different mass bias correction procedures for the measurement of mercury species-specific isotopic composition by gas chromatography coupled to multicollector ICP-MS.** More specifically, the primary and secondary reference standards (NIST SRM-3133 and NIST RM-8610, respectively) will be analysed in several measurement sessions using GC-MC-ICP-

## Objectives

---

MS. The data will be corrected by applying two internal correction models (Russell and Baxter) and two external correction procedures (SSB and Baxter's model).

### B.2.4. Objective IV

**Determination of inorganic mercury isotope ratios by Gas Chromatography coupled to MC-ICP-MS using a  $^{199}\text{Hg}/^{201}\text{Hg}$  double spike for the internal correction of mass discrimination.** Particularly, a double tracer solution will be characterised and the primary and secondary reference standards (NIST SRM-3133 and NIST RM-8610, respectively) will be analysed in several measurement sessions by GC-MC-ICP-MS, applying different GC injection modes (Hot Splitless, Cold Splitless and PTV) and wet and dry plasma conditions. The data will be corrected by applying two internal correction methods (TI and DS) and one external correction procedure (SSB).

### B.2.5. Objective V

**Extending the application range of Hg isotopic analysis using cold vapor generation multi-collector ICP-mass spectrometry to sub- $\mu\text{g L}^{-1}$  concentrations using  $10^{13}$  Ohm Faraday cup amplifiers.** More specifically, the In-house secondary standard will be analysed in several measurement sessions using CVG-MC-ICP-MS, with two cone configurations (standard and jet), two plasma conditions (dry and wet) and three different amplifier configurations (combining the traditional  $10^{11}$  Ohm amplifiers and the  $10^{13}$  Ohm amplifiers). The isotopic composition of mercury in real water samples collected in Jove (Gijón) will also be determined.

---

---



## **C. EXPERIMENTAL**

---



## C.1. Instrumentación

### C.1.1. ICP-MS de tipo cuadrupolo

El equipo ICP-MS de tipo cuadrupolo utilizado a lo largo de este trabajo fue un modelo Agilent 7900 ICP-MS (Agilent Technologies, Tokio, Japón), como el que se muestra en la **Figura 20**. Este equipo cuenta con una celda de colisión de tipo octapolo (ORS), presurizable con helio o hidrógeno, la cual, en nuestro caso, ha actuado únicamente como guía de iones, pues para el mercurio no ha sido necesario eliminar interferencias poliatómicas. El instrumento hace uso de dos conos de Ni (sampler y skimmer), con diámetros internos de 1 y 0,4 mm, respectivamente, y de un detector multiplicador de iones secundarios (SEM).



**Figura 20.** Agilent 7900 ICP-MS.

Previo al análisis, es necesario nebulizar una disolución de calibración multielemental (Li, Y y Tl,  $1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ) para la optimización de la sensibilidad. Esta nebulización se realiza a través del nebulizador de tipo Meinhard y de la cámara de nebulización de doble paso refrigerada de tipo Scott, propios del equipo.

Algunos parámetros experimentales empleados están recogidos en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Parámetros experimentales del Q-ICP-MS empleados.

ICP-MS Agilent 7900ce	
Flujo del gas de arrastre	1,12 L·min <sup>-1</sup>
Tiempo de integración	0,04 s
Isótopos monitorizados (m/z)	198, 199, 200, 201, 202

### C.1.2. ICP-MS de tipo multicolector

Se han utilizado dos equipos ICP-MS de tipo multicolector con analizador de doble enfoque para la medida de relaciones isotópicas de alta precisión, ambos el mismo modelo Thermo Neptune MC-ICP-MS (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania), como el de la **Figura 21**. El primero, instalado en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo y el segundo en la Unidad de Investigación Atómica y de Espectrometría de Masas de la Universidad de Gante.



**Figura 21.** Thermo Neptune MC-ICP-MS.

Los dos equipos poseen un sector electroestático y un sector magnético en configuración Nier-Johnson directa y nueve copas de Faraday, que permiten una detección simultánea en un rango de masas de  $\pm 8,5\%$  con respecto a la masa de la copa central, que es fija.

Las diferencias entre ambos instrumentos recaen en la interfase y en el sistema de detección. El equipo de la Universidad de Gante posee una interfase conocida como *Jet*, con una bomba de alto rendimiento y unos conos especiales como los de la **Figura 22 b)**. La geometría del cono *sampler* de la interfase *Jet* es diferente a la del cono estándar, mientras que el cono *skimmer Jet* presenta una forma más afilada. Respecto al sistema de detección, las nueve copas Faraday del instrumento de la Universidad de Oviedo están asociadas a amplificadores de  $10^{11} \Omega$ , en cambio, el equipo de la Universidad de Gante cuenta con cuatro amplificadores de  $10^{13} \Omega$ , lo que permite medir relaciones isotópicas de manera precisa a concentraciones más bajas.



**Figura 22.** a) *Sampler* y *skimmer* estándar. b) *Sampler* y *skimmer Jet*.

Antes de cada sesión de medida es necesario monitorizar la forma de pico y realizar una ganancia entre las copas de Faraday, además de optimizar los flujos de Ar. Algunos parámetros experimentales aplicados se encuentran recogidos en la **Tabla 6**.

## Experimental

---

**Tabla 6.** Parámetros experimentales del MC-ICP-MS empleados.

Thermo Neptune MC-ICP-MS									
Potencia RF	1200 W								
Resolución	Baja								
Tiempo de integración	0.132 s				4,194 s				
Ciclos/Bloques	2500/1				50/1				
Configuración de las copas de Faraday	L4	L3	L2	L1	C	H1	H2	H3	H4
	-	<sup>198</sup> Hg	<sup>199</sup> Hg	<sup>200</sup> Hg	<sup>201</sup> Hg	<sup>202</sup> Hg	<sup>203</sup> Tl	<sup>205</sup> Tl	-

### C.1.3. Cromatógrafo de gases

Se han utilizado dos modelos de cromatógrafo de gases distintos: un cromatógrafo Agilent 6890N, algo más antiguo, y un cromatógrafo Agilent 7890A, como el de la **Figura 23**.



**Figura 23.** Cromatógrafo de gases Agilent 7890A (Agilent Technologies, Tokyo, Japón).

El cromatógrafo Agilent 6890N cuenta con un inyector *split/splitless* convencional, mientras que el cromatógrafo Agilent 7890A posee dos inyectores, uno en el frente, *split/splitless* convencional y un inyector multimodo, en la parte trasera que permite la inyección de altos volúmenes (PTV). Además, el cromatógrafo Agilent 7890A dispone de un módulo de muestreador automático de líquidos (ALS) 7693A, que puede colocarse según el inyector a utilizar. En

ambos modelos la columna capilar empleada fue una DBS-5MS Agilent J&W Scientific (5% difenilo, 95% dimetilsiloxano, 30 m x 0,53 mm de diámetro interno, 0,1  $\mu\text{m}$  de espesor de la fase estacionaria). Las condiciones de la separación cromatográfica, así como las de inyección, se encuentran recogidas en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Condiciones de la separación cromatográfica y de inyección.

GC Agilent 6890N / GC Agilent 7890A				
<b>Temperatura de la interfase</b>	270 °C			
<b>Flujo de He</b>	8 mL · min <sup>-1</sup>			
<b>Temperatura inicial</b>	60°C (1 min)			
<b>Rampa 1</b>	60-250°C a 40°C · min <sup>-1</sup>			
<b>Temperatura final</b>	250°C (1 min)			
	Hot	Hot	Cold	PTV
<b>Modo de inyección</b>	Splitless	Splitless	Splitless	
	(6890N)	(7890A)	(7890A)	(7890A)
<b>Temperatura de inyección</b>	250°C	125 °C	60-250 °C	60-250 °C
<b>Volúmen de inyección</b>	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$

Los dos cromatógrafos se acoplaron a los dos tipos de ICP-MS utilizados.

#### C.1.3.1. Acoplamiento GC-Q-ICP-MS

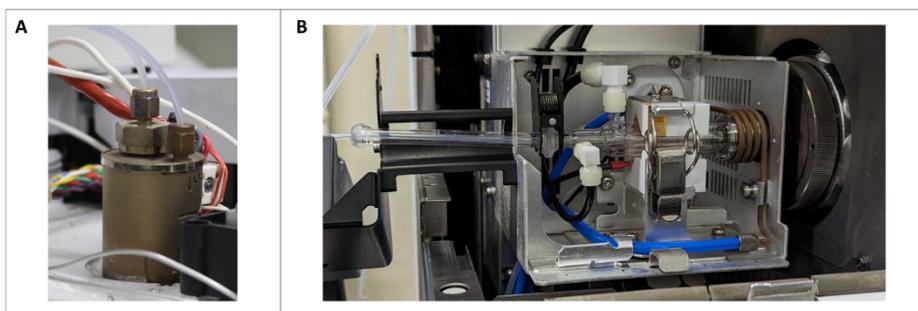
Antes de realizar el acoplamiento entre el GC y el equipo de ICP-MS de tipo cuadrupolo, se optimizan los parámetros por medio de nebulización convencional. Después, se retira la cámara de nebulización para conectar ambos

## Experimental

---

instrumentos a través de una interfase que consta de un bloque metálico calentado a 270°C y dos tubos de PFA.<sup>108</sup>

El bloque metálico posee dos conexiones, una de entrada y otra de salida (**Figura 24 A**). La conexión de entrada se conecta mediante un tubo de PFA a la corriente de Ar que irá a la cámara de nebulización, mientras que la conexión de salida se introduce directamente en la antorcha, gracias a una pieza de vidrio y a un *o-ring* (**Figura 24 B**).



**Figura 24.** Acoplamiento GC-Q-ICP-MS. A) Bloque metálico calentado a 270°C. B) Tubo de PFA introducido en la antorcha.

El Ar que entra en el bloque metálico se calienta a través de un tubo helicoidal para minimizar la condensación de los analitos, que son arrastrados al ICP al salir de la columna a través del tubo de salida.

El diseño descrito permite trabajar en condiciones de plasma seco.

### C.1.3.2. Acoplamiento GC-MC-ICP-MS

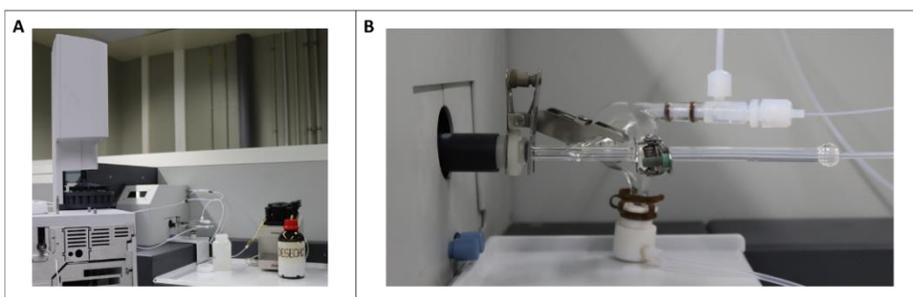
El acoplamiento del GC al equipo MC-ICP-MS se puede realizar en condiciones de plasma seco y húmedo.

---

<sup>108</sup> Bayón, M. M., Camblor, M. G., Alonso, J. I. G., Sanz-Medel, A., 1999. An alternative GC-ICP-MS interface design for trace element speciation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14(9), 1317-1322.

En condiciones de plasma seco, el acoplamiento se lleva a cabo del mismo modo que el acoplamiento GC-Q-ICP-MS, introduciendo el tubo de PFA de salida directamente en la antorcha.

En condiciones de plasma húmedo, se mezclan “en línea” una disolución de talio y el flujo de gas portador, encargado del transporte de los analitos al ICP (Figura 25 A). Para ello, la disolución de TI se introduce con un nebulizador concéntrico de PFA de  $700 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$  a una cámara de nebulización ciclónica, que se conecta a su vez, por medio de una pieza de vidrio en Y, al tubo de PFA de salida de la interfase del GC (Figura 25 B).



**Figura 25.** Acoplamiento GC-MC-ICP-MS en condiciones de plasma húmedo. A) Disposición instrumental. B) Conexión entre la cámara de nebulización ciclónica y el tubo de PFA de la salida del GC por medio de una pieza de vidrio en Y.

#### C.1.4. Unidad de vapor frío

La unidad de vapor frío y de generación de hidruros empleada es una unidad HGX-200 (Teledyne Cetac Technologies, EE.UU.) como la de la Figura 26.



**Figura 26.** Unidad de vapor frío y de generación de hidruros HGX-200.

Este sistema permite la generación de  $\text{Hg}(0)$  vapor antes de su introducción al ICP-MS a partir de la reducción de  $\text{Hg}(\text{II})$  a  $\text{Hg}(0)$  con  $\text{Sn}(\text{II})$ . La muestra se mezcla con una solución de  $\text{SnCl}_2$  para generar el  $\text{Hg}(0)$ , que es arrastrado por medio del gas de muestra al equipo con una eficiencia de transporte del 100%.

El sistema posee un separador gas-líquido en forma de U con un filtro de membrana inerte, que permite reducir el ruido de fondo.

Es necesario guardar el sistema con agua Milli-Q en su interior.

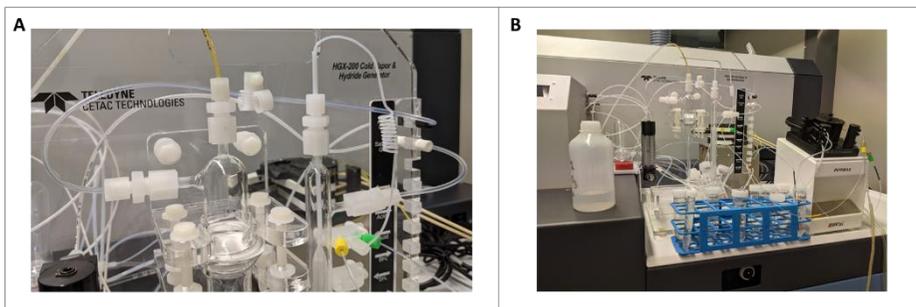
### C.1.4.1. Acoplamiento CVG-MC-ICP-MS

La unidad posee dos entradas, una para el gas de muestra y otra para el gas adicional (**Figura 27 A**), que facilita el arrastre del  $\text{Hg}(0)$  (ambas corrientes de gas provienen del equipo MC-ICP-MS) y su acoplamiento puede también realizarse en condiciones de plasma húmedo y seco.

Para las condiciones de plasma seco, el tubo de salida del  $\text{Hg}(0)$  vapor se conecta directamente a la antorcha.

Para las condiciones de plasma húmedo, el tubo de salida se conecta a través de una pieza en T al aerosol de talio formado con un nebulizador concéntrico

( $100 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ ) y una cámara de nebulización ciclónica con una subunidad de tipo Scott (**Figura 27 B**).



**Figura 27.** Acoplamiento en condiciones de plasma húmedo CVG-MC-ICP-MS. A) Entrada del gas de muestra y del gas adicional al CVG. B) Conexión entre la cámara de nebulización ciclónica con una subunidad de tipo Scott y la unidad CVG.

### C.1.5. GC-EI-MS/MS

El equipo de GC-EI-MS/MS utilizado es un instrumento Agilent 7000C de triple cuadrupolo, el cual está acoplado a un cromatógrafo de gases modelo 7890A (Agilent Technologies), como el de la **Figura 28**.



**Figura 28.** GC-EI-MS/MS Agilent 7000C.

## Experimental

---

Este equipo utiliza una columna cromatográfica DB-5MS (reticulada 5% fenilmetil siloxano, 30 m x 0,25 mm d.i., revestimiento de 0,25 mm) para la separación de los compuestos. La columna cromatográfica, al igual que el espectrómetro de masas, están conectados a un tubo de sílice fundida que permite operar en modo *back-flush* sin afectar al vacío del equipo.

Antes de cada sesión de medida se optimizan las condiciones gracias a la opción de *autotune* del instrumento, que utiliza perfluorotributilamina (PFTBA) para calibrar las masas desde 69 a 502 m/z, con la celda de colisión encendida o apagada, en función del modo de medida a utilizar. Algunos parámetros experimentales, tanto del espectrómetro de masas, como del cromatógrafo de gases están recogidos en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Parámetros experimentales GC-EI-MS y GC-EI-MS/MS.

Agilent 7000C	
Energía de ionización	70 eV
Tiempo de <i>Dwell</i>	10 ms (resolución unidad)
Masas monitorizadas (SIM) (m/z)	<b>MeHg:</b> 256, 257, 258, 259, 260 <b>EtHg:</b> 270, 271, 272, 273, 274 <b>Hg(II):</b> 284, 285, 286, 287, 288
Transiciones monitorizadas (SRM) (m/z)	<b>MeHg:</b> 256→241, 257→242, 258→243, 259→244, 260→245 <b>EtHg:</b> 270→241, 271→242, 272→243, 273→244, 274→245 <b>Hg(II):</b> 284→241, 285→242, 286→243, 287→244, 288→245
Energía de colisión	<b>MeHg:</b> 0 V <b>EtHg:</b> 0 V <b>Hg(II):</b> 1 V
Flujo de He (SRM)	2,25 mL·min <sup>-1</sup>
Flujo de N <sub>2</sub> (SRM)	0,5 mL·min <sup>-1</sup>
Parámetros GC	
Flujo de He	2 mL·min <sup>-1</sup>
Temperatura inicial	50°C (1min)
Rampa 1	50-90°C a 20 °C·min <sup>-1</sup>
Rampa 2	90-100°C a 15 °C·min <sup>-1</sup>
Rampa 3	100-120°C a 10 °C·min <sup>-1</sup>
Rampa 4	120-300°C a 40 °C·min <sup>-1</sup>
Temperatura final	300°C (1 min)
Modo de inyección	Hot Spitless
Temperatura de inyección	250°C
Volumen de inyección	2 μL

### C.1.6. Otra instrumentación

- Sistema de extracción por microondas focalizadas Discover (CEM, Matthews, NC, EE.UU.)

El sistema microondas empleado (**Figura 29**) cuenta con un muestreador automático Explorer (CEM).



**Figura 29.** Sistema microondas Discover (CEM).

Las condiciones de digestión utilizadas se encuentran recogidas en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.** Condiciones de digestión para el microondas Discover (CEM).

Microondas Discover (CEM)	
Tiempo de extracción	4 min
Temperatura de extracción	70°C

- pH-metro Basic 20 CRISON (Alella, Barcelona, España)
- Balanza analítica Mettler Toledo MS Semi-micro MA 205DU (Mettler Toledo, Barcelona, España)
- Placa calefactora Savillex HPX-200 (Savillex, Minnetonka, MN, EE.UU.)
- Centrífuga CENTRO-8 BL (JP Selecta, Barcelona, España)
- Evaporador Mini-Vap (Supelco, Bellefonte PA)

## C.2. Materiales y reactivos

### C.2.1. Patrones de abundancia natural y enriquecidos isotópicamente

Los patrones de abundancia natural MeHg, EtHg y Hg(II) se compraron a Sigma-Aldrich. Los patrones enriquecidos Me<sup>201</sup>Hg, Et<sup>198</sup>Hg, <sup>199</sup>Hg(II) y <sup>201</sup>Hg(II) se adquirieron en ISC-Science S.L. (Oviedo, España). Las disoluciones de trabajo de los patrones orgánicos se prepararon por dilución en una mezcla 3:1 de ácido acético (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.) y metanol (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EE.UU.) y se guardaron a -18°C hasta su uso. Las disoluciones de trabajo de los patrones <sup>nat</sup>.Hg(II), <sup>199</sup>Hg(II) y <sup>201</sup>Hg(II) se prepararon por dilución en ácido clorhídrico ultrapuro al 2% en agua Milli-Q ( $\geq 18 \text{ M}\Omega$ ) y se almacenaron a 4°C hasta su utilización.

### C.2.2. Materiales de referencia

Los materiales de referencia certificados de pelo humano IAEA-085 e IAEA-086 se adquirieron en la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA, Viena, Austria). El material de referencia certificado de hígado de pez perro DOLT-4 se obtuvo del Consejo Nacional de Investigación de Canadá (Ottawa, Canadá). El material de referencia de sangre de cabra 955c se obtuvo del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología de los Estados Unidos (NIST, Gaithersburg, MD, EE.UU.), al igual que los materiales de referencia certificados en relaciones isotópicas NIST SRM 3133 y NIST SRM 8610 (nuevo UM Almadén).

### C.2.3. Reactivos generales

La digestión de las muestras se realizó en hidróxido de tetrametilamonio al 25% (TMAH) (Sigma-Aldrich). Se usó acetato de sodio (Sigma-Aldrich) y ácido acético (Sigma-Aldrich) para preparar una disolución tampón 0,1 M (pH 4). La

propilación de los compuestos de mercurio se llevó a cabo con una disolución de tetra-n-propilborato al 2% en agua Milli-Q ( $\geq 18 \text{ M}\Omega$ ), mientras que la etilación se realizó con tetra-n-etilborato, también al 2% en agua Milli-Q. Ambos reactivos se adquirieron a LGC-Standards al 20% y se dividieron en alícuotas de 400  $\mu\text{L}$  almacenadas a  $-18^\circ\text{C}$  hasta su uso. Se usó hexano (Sigma-Aldrich) como fase orgánica para extraer los compuestos de mercurio derivatizados. La limpieza de las muestras se realizó con columnas de fabricación propia empaquetadas con Florisil® (Sigma-Aldrich).

Para la reducción del mercurio en la unidad de vapor frío se utilizó  $\text{SnCl}_2$  (Sigma-Aldrich).

### C.2.4. Material de laboratorio

Las micropipetas de 1-10 mL, 200-1000  $\mu\text{L}$ , 20-100  $\mu\text{L}$  y 2-20  $\mu\text{L}$  se adquirieron en High Tech (Polonia) y Eppendorf (Alemania). Los viales de 22 mL, 8 mL, 2 mL (ámbar y transparentes) y los viales con inserto se compraron en Scharlab (Barcelona, España). Los viales de PFA de 15 mL con fondo redondeado se compraron en ISC-Science S.L. (Oviedo, España). Los tubos de vidrio de 10 mL, tapones y barras de agitación magnética de PTFE usados en las digestiones por microondas se adquirieron en CEM Corporation.

## C.3. Procedimientos experimentales

### C.3.1. Recogida de muestra

Las muestras de pelo humano analizadas por medio de GC-ICP-MS en el **Capítulo II** se recogieron utilizando unas tijeras de acero inoxidable y se guardaron hasta su análisis correctamente etiquetadas. Los individuos participantes en el estudio, todos provenientes de áreas de Colombia afectadas por la minería artesanal de oro, dieron su consentimiento firmado y aportaron datos relacionados con su peso, altura, edad, sexo, hábitos de consumo de pescado y empleo.

Las muestras de agua analizadas por medio de CVG-MC-ICP-MS en el **Capítulo V** se recogieron utilizando tubos Falcon de 50 mL. Se recolectaron tres alícuotas de tres fuentes situadas en una zona industrial de Gijón (Jove) y se acidificaron con HCl al 2%. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

### C.3.2. Preparación de muestra para la cuantificación de las especies de mercurio

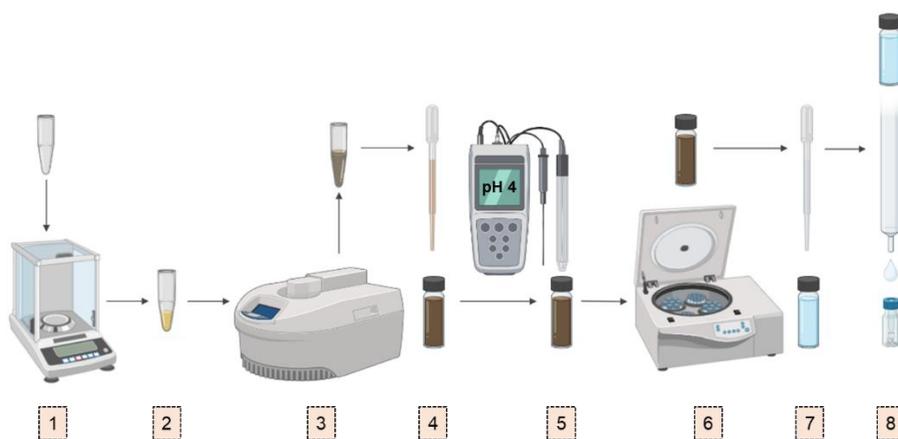
La cantidad de muestra requerida (0,1 g en el caso de ser una muestra de pelo humano) se pesa directamente en un vial de microondas de 10 mL. Inmediatamente después, se añaden las cantidades apropiadas de los trazadores,  $^{199}\text{Hg(II)}$ ,  $^{201}\text{MeHg}$  y  $^{198}\text{EtHg}$  (si procede), manteniendo una relación de entre 0,1 y 10 entre los compuestos naturales y los enriquecidos (paso 1 del esquema de la **Figura 30**). Después, se añaden 3 mL de TMAH al 25% y la barra de agitación magnética y se cierra el vial con una tapa de Teflón para llevar a cabo la digestión (pasos 2 y 3 de la **Figura 30**). Tras la digestión de la muestra, el extracto es transferido a un vial transparente que contiene 4 mL de disolución reguladora de ácido acético y acetato de sodio (pH 4) y se ajusta el pH de la mezcla a 4,

## Experimental

---

añadiendo gotas de HCl *subboiling* concentrado (pasos 4 y 5 de la **Figura 30**). Para la derivatización de la muestra, se añaden 0,4 mL de tetra-n-propilborato de sodio (tetra-n-etilborato de sodio, en el caso de realizar únicamente la determinación de MeHg y Hg(II)) al 2% en agua Milli-Q y 2 mL de hexano al vial y se agita manualmente durante 5 minutos. Después, la muestra es centrifugada durante 5 minutos a 4500 rpm para separar ambas fases (pasos 6 y 7 de la **Figura 30**). Finalmente, la fase orgánica se limpia utilizando las columnas de fabricación casera rellenas de Florisil® y se almacena a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis (paso 8 de la **Figura 30**).

Antes de su inyección en el cromatógrafo de gases, las muestras se preconcentran con una corriente delicada de  $\text{N}_2$  en el evaporador Mini-Vap hasta un volumen aproximado de 30  $\mu\text{L}$ .



**Figura 30.** Esquema del procedimiento de preparación de muestra para la cuantificación de las especies de mercurio.

Para la elaboración de los blancos de procedimiento se sigue el mismo protocolo sin añadir cantidad de muestra.

### C.3.3. Preparación de muestra para la cuantificación de mercurio total

La preparación de muestra para la cuantificación de Hg total se llevó a cabo de un modo similar al utilizado para la cuantificación de las especies de Hg. En este caso, la cantidad de muestra requerida (0,1 g) se pesó en un vial de PFA de 15 mL e inmediatamente después se añadió el trazador isotópico enriquecido  $^{199}\text{Hg(II)}$ , manteniendo la ya mencionada relación de entre 0,1 y 10. Después se añadieron 3 mL de  $\text{HNO}_3$  *subboiling* y, tras un correcto cierre del vial, se colocó durante 4 horas a  $110^\circ\text{C}$  en la placa calefactora. Tras la digestión de la muestra se esperó a que el vial estuviera a temperatura ambiente para seguir exactamente los mismos pasos que los seguidos para la cuantificación de las especies de Hg. (Paso 4 y posteriores de la **Figura 30**.)

### C.3.4. Preparación de muestra para la medida de los $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$

#### C.3.4.1 Preparación de muestra para la medida por GC-MC-ICP-MS

Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de los materiales NIST SRM 3133 y NIST SRM 8610 y se pueden distinguir dos procedimientos distintos, en función de si las medidas se realizan en condiciones de plasma húmedo o seco.

Para las medidas en condiciones de plasma húmedo, se añaden 250 ng de Hg(II) a un vial con 4 mL de disolución reguladora de ácido acético y acetato de sodio (pH 4). Después, se añaden 200  $\mu\text{L}$  de tetra-n-etilborato de sodio al 2% en agua Milli-Q y 1 mL de hexano. Para realizar la derivatización y la extracción, se agita el vial manualmente durante 5 minutos. Finalmente, la fase orgánica se transfiere a un vial de 2 mL y se guarda a  $-18^\circ\text{C}$  hasta su análisis.

Para las medidas en condiciones de plasma seco, el procedimiento es prácticamente igual, pero se añade, tras la adición del material de referencia de

Hg(II) natural, una disolución de doble trazador compuesta de una mezcla de  $^{199}\text{Hg(II)}$  y  $^{201}\text{Hg(II)}$  (DS).

### C.3.4.2. Preparación de muestra para la medida por CVG-MC-ICP-MS

Se utilizaron disoluciones de los materiales NIST SRM 3133 y NIST SRM 8610, además de un patrón de Hg caracterizado *In-House* (IH). Las disoluciones de trabajo se prepararon por dilución de los materiales con una disolución de HCl/HNO<sub>3</sub> *subboiling* al 2,5% en agua Milli-Q.

### C.3.5. Medida de las relaciones isotópicas de Hg por GC-Q-ICP-MS

#### C.3.5.1. Análisis mediante GC-Q-ICP-MS

La cuantificación de las especies de Hg por GC-ICP-MS se realizó en el modo de análisis de tiempo resuelto (TRA), tras la optimización diaria de las lentes usando los iones poliatómicos  $^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$  y  $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ . Se midieron los isótopos del 198 al 202 y se utilizaron 0,04 s de tiempo de integración. Los picos cromatográficos se integraron con el programa *Chromatographic Data Analysis*, para obtener las relaciones isotópicas a partir de las áreas de pico.

#### C.3.5.2. Caracterización de los trazadores isotópicos enriquecidos ( $^{199}\text{Hg(II)}$ , $^{201}\text{MeHg}$ y $^{198}\text{EtHg}$ )

Para el análisis por dilución isotópica es necesario caracterizar los trazadores isotópicos enriquecidos en términos de concentración, abundancias e impurezas.

Para determinar la concentración de los trazadores se aplica la dilución isotópica inversa, mediante el uso de patrones de abundancia isotópica natural con concentraciones conocidas. En este caso hay un cambio en los roles, ya que el patrón de abundancia natural es utilizado como trazador, mientras que el trazador isotópico enriquecido es considerado como analito.

La caracterización de las abundancias es relativamente más sencilla, pues se hace experimentalmente a partir de las áreas de pico de las disoluciones diluidas de los patrones, obtenidas por GC-Q-ICP-MS.

Para la determinación de las impurezas del  $^{201}\text{MeHg}$  aplica la dilución isotópica simple, añadiendo  $^{199}\text{Hg(II)}$  a un nivel de concentración muy bajo, que permita la cuantificación de la impureza de  $\text{Hg(II)}$ , proveniente de la degradación del  $^{201}\text{MeHg}$ .

### C.3.5.3. Determinación de la concentración de las especies de mercurio por deconvolución de perfiles isotópicos

Teniendo en cuenta un sistema de dos especies,  $\text{Hg(II)}$  y  $\text{MeHg}$  en nuestro caso, se pueden establecer los balances de masa de la **Figura 31**. A una muestra, que contiene una mezcla desconocida de  $\text{Hg(II)}$  y  $\text{MeHg}$  ( $N_{\text{nat,Hg(II)}}$  y  $N_{\text{nat,MeHg}}$ ) se le añaden los trazadores isotópicos enriquecidos ( $N_{\text{t,Hg(II)}}$  y  $N_{\text{t,MeHg}}$ ), la cual, tras la interconversión de las especies, contendrá  $N_{\text{m}}^{\text{Hg(II)}}$  y  $N_{\text{m}}^{\text{MeHg}}$ . Cada una de las especies en la mezcla final será, por tanto, la suma de la contribución de la especie natural y los trazadores, considerando los factores de interconversión ( $F_1$  y  $F_2$ ).<sup>54</sup>

$$\begin{array}{ccc}
 \begin{array}{c} N_{\text{t,Hg(II)}} \\ \diagdown \\ N_{\text{nat,Hg(II)}} \end{array} & & \begin{array}{c} N_{\text{t,MeHg}} \\ \diagdown \\ N_{\text{nat,MeHg}} \end{array} \\
 & \text{=} & \\
 & \downarrow & \\
 N_{\text{m}}^{\text{Hg(II)}} = N_{\text{nat}}^{\text{Hg(II)}} + N_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{Hg(II)}} + N_{\text{t,MeHg}}^{\text{Hg(II)}} \frac{F_2}{F_1} & & N_{\text{m}}^{\text{MeHg}} = N_{\text{nat}}^{\text{MeHg}} + N_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{MeHg}} + N_{\text{t,MeHg}}^{\text{MeHg}}
 \end{array}$$

**Figura 31.** Balances de masa de las especies  $\text{Hg(II)}$  y  $\text{MeHg}$  adaptado de Alonso, J. *et al.*<sup>54</sup>

Se han propuesto varios modelos matemáticos para resolver estos balances de masa y, obtener así, la concentración de las especies en la muestra inicial, sin

embargo, la mejor de las opciones es el cálculo por deconvolución de perfiles isotópicos (IPD), desarrollado por Meija *et al.* en 2006.<sup>109</sup>

Considerando de nuevo el sistema de dos especies (Hg(II) y MeHg), se pueden escribir las ecuaciones para una masa  $i$  a partir de los balances de masa previamente establecidos y de las abundancias isotópicas ( $A$ ), medidas y conocidas:

$$N_m^{\text{Hg(II)}} A_m^i = N_{\text{nat}}^{\text{Hg(II)}} A_{\text{nat}}^i + N_{\text{t,MeHg}}^{\text{Hg(II)}} A_{\text{t,MeHg}}^i + N_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{Hg(II)}} A_{\text{t,Hg(II)}}^i \quad (17)$$

$$N_m^{\text{MeHg}} A_m^i = N_{\text{nat}}^{\text{MeHg}} A_{\text{nat}}^i + N_{\text{t,MeHg}}^{\text{MeHg}} A_{\text{t,MeHg}}^i + N_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{MeHg}} A_{\text{t,Hg(II)}}^i \quad (18)$$

Si se dividen los balances de masa iniciales y las ecuaciones (17) y (18) y se tienen en cuenta las fracciones molares se obtiene:

$$A_{\text{m,Hg(II)}}^i = X_{\text{nat}}^{\text{Hg(II)}} A_{\text{nat}}^i + X_{\text{t,MeHg}}^{\text{Hg(II)}} A_{\text{t,MeHg}}^i + X_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{Hg(II)}} A_{\text{t,Hg(II)}}^i \quad (19)$$

$$A_{\text{m,MeHg}}^i = X_{\text{nat}}^{\text{MeHg}} A_{\text{nat}}^i + X_{\text{t,MeHg}}^{\text{MeHg}} A_{\text{t,MeHg}}^i + X_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{MeHg}} A_{\text{t,Hg(II)}}^i \quad (20)$$

donde  $X_{\text{nat}}^{\text{Hg(II)}}$ ,  $X_{\text{t,MeHg}}^{\text{Hg(II)}}$  y  $X_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{Hg(II)}}$  son:

$$X_{\text{nat}}^{\text{Hg(II)}} = \frac{N_{\text{nat}}^{\text{Hg(II)}}}{N_{\text{nat}}^{\text{Hg(II)}} + N_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{Hg(II)}} + N_{\text{t,MeHg}}^{\text{Hg(II)}}} \quad (21)$$

$$X_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{Hg(II)}} = \frac{N_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{Hg(II)}}}{N_{\text{nat}}^{\text{Hg(II)}} + N_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{Hg(II)}} + N_{\text{t,MeHg}}^{\text{Hg(II)}}} \quad (22)$$

$$X_{\text{t,MeHg}}^{\text{Hg(II)}} = \frac{N_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{Hg(II)}}}{N_{\text{nat}}^{\text{Hg(II)}} + N_{\text{t,Hg(II)}}^{\text{Hg(II)}} + N_{\text{t,MeHg}}^{\text{Hg(II)}}} \quad (23)$$

(De manera análoga pueden escribirse las fracciones molares para el MeHg).

Las ecuaciones (19) y (20) pueden escribirse de forma matricial para todas las masas nominales. En este caso, el sistema está conformado por los isótopos de

---

<sup>109</sup> Meija, J., Yang, L., Caruso, J. A., & Mester, Z., 2006. Calculations of double spike isotope dilution results revisited. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21(11), 1294-1297.

mercurio con masas del 198 al 202 de tal manera que pueden escribirse las matrices:

$$\begin{pmatrix} A_{m,Hg(II)}^{198} \\ A_{m,Hg(II)}^{199} \\ A_{m,Hg(II)}^{200} \\ A_{m,Hg(II)}^{201} \\ A_{m,Hg(II)}^{202} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_{nat}^{198} & A_{t,MeHg}^{198} & A_{t,Hg(II)}^{198} \\ A_{nat}^{199} & A_{t,MeHg}^{199} & A_{t,Hg(II)}^{199} \\ A_{nat}^{200} & A_{t,MeHg}^{200} & A_{t,Hg(II)}^{200} \\ A_{nat}^{201} & A_{t,MeHg}^{201} & A_{t,Hg(II)}^{201} \\ A_{nat}^{202} & A_{t,MeHg}^{202} & A_{t,Hg(II)}^{202} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} X_{nat}^{Hg(II)} \\ X_{t,Hg(II)}^{Hg(II)} \\ X_{t,MeHg}^{Hg(II)} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} e^{198} \\ e^{199} \\ e^{200} \\ e^{201} \\ e^{202} \end{pmatrix} \quad (24)$$

$$\begin{pmatrix} A_{m,MeHg}^{198} \\ A_{m,MeHg}^{199} \\ A_{m,MeHg}^{200} \\ A_{m,MeHg}^{201} \\ A_{m,MeHg}^{202} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_{nat}^{198} & A_{t,MeHg}^{198} & A_{t,Hg(II)}^{198} \\ A_{nat}^{199} & A_{t,MeHg}^{199} & A_{t,Hg(II)}^{199} \\ A_{nat}^{200} & A_{t,MeHg}^{200} & A_{t,Hg(II)}^{200} \\ A_{nat}^{201} & A_{t,MeHg}^{201} & A_{t,Hg(II)}^{201} \\ A_{nat}^{202} & A_{t,MeHg}^{202} & A_{t,Hg(II)}^{202} \end{pmatrix} \times \begin{pmatrix} X_{nat}^{MeHg} \\ X_{t,Hg(II)}^{MeHg} \\ X_{t,MeHg}^{MeHg} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} e^{198} \\ e^{199} \\ e^{200} \\ e^{201} \\ e^{202} \end{pmatrix} \quad (25)$$

En ambas ecuaciones, las fracciones molares se pueden calcular por medio de regresión lineal múltiple aplicando el ajuste por mínimos cuadrados y minimizando el vector error (e), ya que las abundancias naturales de la muestra y los trazadores son conocidas y las abundancias de la mezcla se obtienen experimentalmente por medio de GC-Q-ICP-MS.

A partir de las cantidades conocidas de trazadores añadidos ( $N_{t,Hg(II)}$  y  $N_{t,MeHg}$ ) y de las fracciones molares obtenidas previamente, pueden calcularse las cantidades de las especies en la mezcla ( $N_m^{Hg(II)}$  y  $N_m^{MeHg}$ ), resolviendo las ecuaciones (26) y (27):

$$X_{t,Hg(II)}^{Hg(II)} N_m^{Hg(II)} + X_{t,Hg(II)}^{MeHg} N_m^{MeHg} = N_{t,Hg(II)} \quad (26)$$

$$X_{t,MeHg}^{Hg(II)} N_m^{Hg(II)} + X_{t,MeHg}^{MeHg} N_m^{MeHg} = N_{t,MeHg} \quad (27)$$

Finalmente, las concentraciones corregidas se obtienen resolviendo el sistema de dos ecuaciones y dos incógnitas:

$$X_{nat}^{Hg(II)} N_m^{Hg(II)} = N_{nat,Hg(II)} \times (1 - F_2) + F_1 N_{nat,MeHg} \quad (28)$$

$$X_{nat}^{MeHg} N_m^{MeHg} = F_2 N_{nat,Hg(II)} + (1 - F_2) \times N_{nat,MeHg} \quad (29)$$

donde los factores F1 y F2 son, respectivamente:

$$F_1 = \frac{X_{t,MeHg}^{Hg(II)} N_m^{Hg(II)}}{N_{t,MeHg}} \quad (30)$$

$$F_2 = \frac{X_{t,Hg(II)}^{MeHg} N_m^{MeHg}}{N_{t,Hg(II)}} \quad (31)$$

Para sistemas más complejos, como el conformado por las tres especies de Hg, EtHg, MeHg y Hg(II), se aplica el mismo procedimiento de cálculo teniendo en cuenta que los factores de interconversión son seis en este caso, ya que las tres especies son susceptibles de convertirse entre sí.<sup>110</sup>

### C.3.5.4. Corrección de los efectos de la discriminación de masas

El fenómeno de la discriminación de masas afecta a los equipos de plasma de acoplamiento inductivo, como se comentaba en la sección **A.4.5.3.** de la introducción. Para corregirlo existen múltiples estrategias y, en el caso de aplicar la dilución isotópica, se puede aprovechar la suma cuadrática de los residuales de la estimación lineal entre las abundancias naturales de la muestra y los trazadores y las abundancias experimentales de la mezcla.

Esta suma cuadrática de los residuales de las dos (en un sistema de MeHg Y Hg(II)) o tres (en un sistema de EtHg, MeHg y Hg(II)) especies se minimiza iterativamente aplicando la función SOLVER del Microsoft Excel mediante la variación del factor de corrección de la discriminación de masa (K). Una vez que se obtiene el factor de discriminación de masa definitivo se aplica el modelo de corrección lineal de la ecuación **(32)**:

$$R_{corr} = \frac{R_{exp}}{1 + K \times \Delta M} \quad (32)$$

---

<sup>110</sup> Queipo Abad, S., Rodríguez-Gonzalez, P., Davis, W. C., & Garcia Alonso, J. I., 2017. Development of a common procedure for the determination of methylmercury, ethylmercury, and inorganic mercury in human whole blood, hair, and urine by triple spike species-specific isotope dilution mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 89(12), 6731-6739.

### C.3.6. Medida de las relaciones isotópicas de Hg por medio de GC-(EI)-MS/MS

#### C.3.6.1. Análisis mediante GC-EI-MS

Las condiciones para la medida por GC-EI-MS se optimizaron diariamente utilizando la opción *autotune* del instrumento. Las masas monitorizadas en el modo SIM se encuentran recogidas en la **Tabla 8**, al igual que las condiciones del cromatógrafo de gases. Para una correcta limpieza de la columna, tras cada separación cromatográfica se aplicó el modo *back-flush*, durante 4 minutos a 300°C y a una presión constante de 50 psi. Las distribuciones isotópicas se calcularon dividiendo el área de pico medida para cada una de las masas entre la suma de todas las áreas de pico medidas para un determinado clúster molecular.

Para la determinación de las especies de Hg por medio de GC-EI-MS se aplicó también el cálculo por IPD. En este caso, se utilizaron las distribuciones isotópicas de los iones precursores en lugar de las abundancias medidas directamente para GC-ICP-MS.

#### C.3.6.2. Pureza espectral del clúster del ion molecular

Para poder determinar la distribución isotópica de un compuesto marcado es necesario determinar su enriquecimiento isotópico, para lo que previamente se ha de calcular la pureza espectral de su análogo de abundancia isotópica natural.

La pureza espectral depende de la contribución de la masa M-1, debida principalmente a la pérdida de un átomo de hidrógeno o a la falta de resolución espectral de los equipos de tipo cuadrupolo. Para un determinado clúster isotópico, la pureza espectral se puede obtener a partir de la combinación lineal de la distribución isotópica experimental del compuesto natural y de las distribuciones isotópicas teóricas del compuesto M ( $A_M^i$ ) y del mismo compuesto a masa M-1 ( $A_{M-1}^i$ ):

$$\begin{pmatrix} A_{\text{exp}}^1 \\ A_{\text{exp}}^2 \\ \dots \\ A_{\text{exp}}^{n-1} \\ A_{\text{exp}}^n \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A_{M^+}^1 & A_{M-1^+}^1 \\ A_{M^+}^2 & A_{M-1^+}^2 \\ \dots & \dots \\ A_{M^+}^{n-1} & A_{M-1^+}^{n-1} \\ A_{M^+}^n & A_{M-1^+}^n \end{pmatrix} X \begin{pmatrix} X_{M^+} \\ X_{M-1^+} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} e^1 \\ e^2 \\ \dots \\ e^{n-1} \\ e^n \end{pmatrix} \quad (33)$$

donde  $M-1^+$  corresponde a la pérdida de átomos de hidrógeno y al efecto de una insuficiente resolución espectral en el analizador.

### C.3.6.3. Distribuciones isotópicas teóricas de los compuestos naturales y marcados en GC-EI-MS

El cálculo de las distribuciones isotópicas teóricas de los compuestos orgánicos se realizó a partir del algoritmo publicado por Kubinyi<sup>111</sup>, teniendo en cuenta las masas exactas de los elementos y las abundancias de los isótopos naturales y enriquecidos.

La medida de la distribución isotópica de los compuestos de abundancia isotópica natural se validó experimentalmente mediante la comparación de las abundancias experimentales del compuesto y las abundancias teóricas, calculadas a partir de los elementos.

Para el cálculo de las distribuciones isotópicas teóricas de los compuestos enriquecidos se consideraron las abundancias isotópicas obtenidas previamente por medio de GC-Q-ICP-MS (sección **C.3.5.2**). Utilizando el motor de cálculo<sup>112</sup>, que aplica el algoritmo de Kubinyi, se calculan las distribuciones isotópicas teóricas, tanto de los trazadores, como de los posibles productos de interconversión.

---

<sup>111</sup> Kubinyi, H., 1991. Calculation of isotope distributions in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problem. *Analytica Chimica Acta*, 247(1), 107-119.

<sup>112</sup> Alonso, J. I. G., Rodríguez-González, P., González-Gago, A., González-Antuña, A., 2010. Determination of the uncertainties in the theoretical mass isotopomer distribution of molecules. *Analytica chimica acta*, 664(1), 68-76.

Teniendo en cuenta la pureza espectral, calculada previamente, se obtienen las distribuciones isotópicas teóricas de los compuestos:

$$A_{nat}^i = A_{M^+}^i \cdot X_{M^+} + A_{M-1^+}^i \cdot X_{M-1^+} \quad (34)$$

#### C.3.6.4. Análisis mediante GC-EI-MS/MS

Las condiciones de medida para GC-EI-MS/MS también se optimizaron diariamente. Las masas monitorizadas en el modo MRM están recogidas en la **Tabla 8**. Para la disociación de los iones MeHgPr<sup>+</sup> y EtHgPr<sup>+</sup> no se aplicó energía en la celda de colisión, mientras que para el ion HgPr<sup>2+</sup> se aplicó 1eV. El flujo de gas de colisión fue de 0,5 mL min<sup>-1</sup>. Los iones producto seleccionados para las tres especies se corresponden con la pérdida de un grupo Me, Et y Pro en cada uno de los casos.

Para la determinación de las especies por GC-EI-MS/MS se utilizaron las distribuciones isotópicas de los iones producto en lugar de las abundancias medidas directamente en GC-ICP-MS o las distribuciones de los iones precursores en GC-EI-MS.

#### C.3.6.5. Distribuciones isotópicas teóricas de los compuestos naturales y marcados en GC-EI-MS/MS

Las distribuciones isotópicas teóricas de los iones producto, de los compuestos tanto naturales, como enriquecidos, se calcularon utilizando el programa IsoPatrn© desarrollado por Ramaley y Cubero Herrera<sup>113</sup>, ya que se ha de tener en cuenta la contribución de varios isotopólogos de la molécula precursora al mismo ion producto, para lo que el algoritmo propuesto por Kubinyi<sup>111</sup> no resulta adecuado.

---

<sup>113</sup> Ramaley, L., Herrera, L. C., 2008. Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 22(17), 2707-2714.

### C.3.7. Medida de las relaciones isotópicas de Hg por medio de GC-MC-ICP-MS y CVG-MC-ICP-MS

#### C.3.7.1. Análisis mediante GC-MC-ICP-MS

Para la medida por GC-MC-ICP-MS se utilizó el equipo en baja resolución en el modo *static multicollection* aplicando un tiempo de integración de 0,131 s. Los isótopos de Hg del 198 al 202 se recogieron en las copas de Faraday de la L3 a la H1 y los isótopos de Tl (en el caso de aplicar condiciones de plasma húmedo) se recogieron en las copas H2 y H3 (**Tabla 6**). Los isótopos  $^{196}\text{Hg}$  y  $^{204}\text{Hg}$  no se midieron debido a las limitaciones de posición de las copas de Faraday.

Previo a cada sesión de medida, se ajustaron la ventana de las masas, las lentes, la posición de la antorcha y los flujos de Ar por medio de la nebulización de una disolución de Tl de  $20 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ , en condiciones de plasma húmedo. En condiciones de plasma seco se utilizó el ion poliatómico  $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$ .

#### C.3.7.2. Análisis mediante CVG-MC-ICP-MS

Para la medida por medio de CVG-MC-ICP-MS también se utilizó el equipo en baja resolución en el modo *static multicollection*, aunque al tratarse de señales continuas el tiempo de integración fue de 4,194 s. La configuración de copas utilizada fue la misma que para la medida por GC-MC-ICP-MS (**Tabla 6**).

Para la optimización de la ventana de las masas, las lentes, la posición de la antorcha y los flujos de Ar se hizo uso de las disoluciones de trabajo de Hg.

#### C.3.7.3. Corrección del desfase temporal entre las copas de Faraday

Como se comentaba en la introducción (sección **A.4.5.4.**), las copas de Faraday presentan cierto desfase temporal que afecta a la exactitud en la medida de las relaciones isotópicas en señales transientes. Para su corrección se asume que el voltaje registrado por la copa de Faraday L3 para el  $^{198}\text{Hg}$  es el correcto.

Asumiendo también que la señal varía linealmente en el intervalo de desfase temporal y que esta variación es proporcional a la variación durante el tiempo de integración entre dos medidas de un mismo isótopo se puede establecer:

$$\frac{\Delta V}{\Delta t_i} = \frac{\Delta V}{\Delta t} \quad (35)$$

donde  $\Delta t_i$  es el tiempo de integración para la medida de las relaciones isotópicas y  $\Delta t$  el desfase entre la copa de Faraday correspondiente y la copa L3.

A partir del desarrollo de la ecuación (35) se puede obtener:

$$V_{\text{corr}}^{\text{xxx}} = V_2^{\text{xxx}} - \frac{\Delta t}{\Delta t_i} \cdot (V_2^{\text{xxx}} - V_1^{\text{xxx}}) \quad (36)$$

donde  $V_1^{\text{xxx}}$  y  $V_2^{\text{xxx}}$  son los voltajes medidos por la copa con retraso temporal al principio y al final del  $\Delta t_i$ . Los valores  $\Delta t$  fueron calculados previamente, minimizando la suma cuadrática de los residuales de la regresión lineal, utilizada para el cálculo de la relación isotópica.<sup>105</sup>

#### C.3.7.4. Cálculo de las relaciones isotópicas

Los valores de las relaciones isotópicas se calcularon de manera diferente para señales transientes (obtenidas por GC-MC-ICP-MS) y para señales continuas (obtenidas por CVG-MC-ICP-MS).

Para señales transientes se aplicó el método de la pendiente de la regresión lineal (LRS). Este método permite calcular la  $R_i$  como la pendiente ( $b$ ) de la regresión lineal de acuerdo con la ecuación:

$$V^{\text{xxx}} = a + V^{198} \cdot b \quad (37)$$

donde  $V^{\text{xxx}}$  es el voltaje del isótopo  $^{\text{xxx}}\text{Hg}$ ,  $V^{198}$  es el voltaje del isótopo  $^{198}\text{Hg}$  y  $a$  la ordenada en el origen. Esta ecuación se aplica a efectos prácticos utilizando la función Estimación Lineal en Excel a un rango de 321 puntos de Hg (160 puntos de adquisición antes y después del máximo de pico).

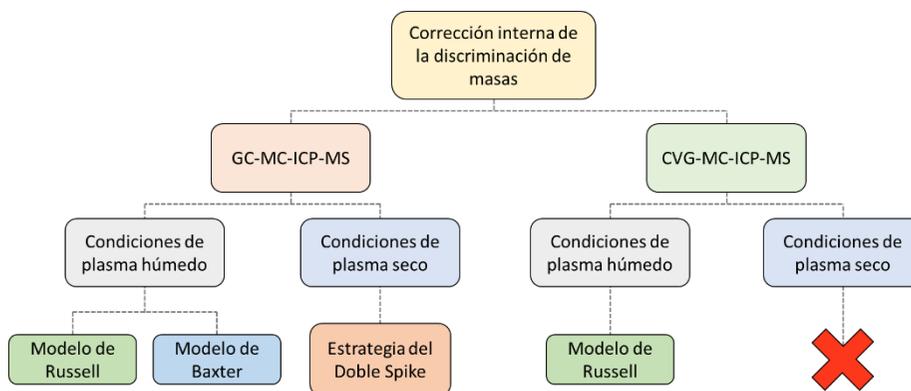
En condiciones de plasma húmedo, con las señales continuas de TI, para obtener la  $R_i$  con la ecuación Estimación Lineal esta se modifica para ajustarse a una recta sin ordenada en el origen (valor 'constante =0' en contraposición al valor 'constante=1' usado en señales transientes).

Para las señales continuas se aplicó el método punto por punto (PbP). Se calcularon relaciones isotópicas para cada una de las medidas individuales realizadas a lo largo de cada adquisición (50 en total) y la relación isotópica final se obtuvo a partir del promedio.

### C.3.7.5. Corrección de la discriminación de masas

De nuevo, es necesario corregir el efecto de la discriminación de masas. A lo largo de esta tesis doctoral se aplicaron diversas estrategias para corregir el efecto de la discriminación de masas en la medida de las relaciones isotópicas de alta precisión y exactitud, pudiendo distinguirse dos grandes grupos, que pueden combinarse: estrategias de corrección internas y estrategias de corrección externas. En esta sección se mencionarán los diferentes métodos de corrección aplicados y se ahondará en ellos en las secciones correspondientes de los **Capítulos III, IV y V**.

Tanto para las medidas realizadas por GC-MC-ICP-MS como para las medidas realizadas por CVG-MC-ICP-MS se aplicaron diversas estrategias de corrección interna de la discriminación de masas atendiendo a las condiciones del plasma, como puede observarse en el esquema de la **Figura 32**.



**Figura 32.** Esquema de las diferentes estrategias aplicadas para la corrección interna de la discriminación de masas.

En condiciones de plasma húmedo y para ambos casos se utilizó el TI como patrón interno. La concentración de la disolución de talio se seleccionó manteniendo siempre una relación entre las señales del  $^{205}\text{Tl}$  y del  $^{202}\text{Hg}$  de un  $\pm 10\%$ . En el caso de las medidas realizadas por CVG-MC-ICP-MS se aplicó el modelo de Russell, mientras que para las medidas realizadas por GC-MC-ICP-MS, además del modelo de Russell, también se hizo uso del modelo de Baxter.<sup>114</sup>

En condiciones de plasma seco, para las medidas por CVG-MC-ICP-MS, no se aplicó ningún tipo de corrección interna. Para las medidas por GC-MC-ICP-MS se aplicó la estrategia del Doble Spike (DS). Esta estrategia se basa en el uso de una disolución, previamente caracterizada, compuesta por una mezcla 1:1 de dos trazadores isotópicos enriquecidos ( $^{199}\text{Hg(II)}$  y  $^{201}\text{Hg(II)}$ ). El doble trazador fue añadido a la muestra al principio del procedimiento analítico en una proporción de aproximadamente 6:4 y permitió corregir todos los procesos de discriminación de masas, no solo acontecidos en el instrumento de medida.

<sup>114</sup> Baxter, D. C., Rodushkin, I., Engström, E., Malinovsky, D. 2006. Revised exponential model for mass bias correction using an internal standard for isotope abundance ratio measurements by multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21(4), 427-430.

## Experimental

---

La estrategia seguida para la corrección de la discriminación de masas externa se basó en la medida del estándar NIST SRM 3133 en todos los casos. La concentración del patrón fue seleccionada coincidiendo con la de las muestras a analizar.

### C.3.7.6. Cálculo de los valores $\delta^{xxx}\text{Hg}$ y $\Delta^{xxx}\text{Hg}$

Para el cálculo de los valores  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  se utilizaron dos métodos. El primero, el método tradicional, comentado en la sección **A.3.1.** de la introducción, que se basa en el SSB y en la ecuación (38) :

$$\delta^{xxx}\text{Hg} (\text{‰}) = \left( \frac{\left( \frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{corregido}}}{\left( \frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{NIST SRM 3133}}} - 1 \right) * 1000 \quad (38)$$

donde  $^{xxx}\text{Hg}$  se refiere a las masas de los isótopos entre el  $^{199}\text{Hg}$  y el  $^{202}\text{Hg}$ . La relación isotópica correspondiente al estándar NIST SRM 3133 es la calculada a partir de la media de las medidas realizadas antes y después de la muestra.

El segundo método, propuesto por Baxter, se basa en la ecuación (39):

$$\delta \text{Hg}^{xxx} (\text{‰}) = \left( \frac{\left( \frac{^{xxx}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}} \right)_{\text{medido}}}{\exp\left( a + b \times \text{Ln} \left( \frac{^{205}\text{Tl}}{^{203}\text{Tl}} \right)_{\text{medido}} \right)} - 1 \right) * 1000 \quad (39)$$

donde **a** y **b** se obtienen a partir de la regresión lineal entre los valores no corregidos de la relación isotópica  $^{xxx}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$  y  $^{205}\text{Tl}/^{203}\text{Tl}$  del NIST SRM 3133. Este método se aplicó únicamente en condiciones de plasma húmedo.

Los valores  $\Delta^{201}\text{Hg}$  y  $\Delta^{199}\text{Hg}$  se calcularon a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\Delta^{201}\text{Hg} = \delta^{201}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0,752) \quad (40)$$

$$\Delta^{199}\text{Hg} = \delta^{199}\text{Hg} - (\delta^{202}\text{Hg} \times 0,252) \quad (41)$$





## **D. RESULTADOS**

---



## **D.1. CAPÍTULO I**

**Comparación de GC-ICP-MS, GC-EI-MS y GC-EI-MS/MS para la determinación de metilmercurio, etilmercurio y mercurio inorgánico en muestras biológicas por dilución isotópica con trazador triple**



### D.1.1. Introducción

Como se adelantaba en la Introducción General, los compuestos de Hg son liberados al medio ambiente por fuentes naturales y antropogénicas, tales como la minería o la quema de combustibles fósiles.<sup>115</sup> El mercurio puede existir a modo de diferentes especies químicas en el medio ambiente, como por ejemplo Hg(0), Hg(II) o MeHg. Estas especies participan en un complejo ciclo biogeoquímico, que se inicia con la liberación de Hg(0) a la atmósfera.<sup>3</sup>

El Hg(0) puede eliminarse de la atmósfera tras su oxidación a Hg(II), el cual se deposita en los ecosistemas terrestres y acuáticos. En los ecosistemas acuáticos, en la interfase agua-sedimento, las bacterias pueden metilar el Hg(II)<sup>116</sup> produciendo MeHg. Dicho MeHg es un compuesto altamente neurotóxico, que puede ser biomagnificado a través de la cadena trófica, lo que provoca un alto riesgo de envenenamiento en los depredadores de los niveles tróficos superiores. Así pues, los seres humanos estamos expuestos al MeHg a través del consumo de pescado y marisco.<sup>117</sup> Otras especies organomercuriales, como el EtHg, tienen un comportamiento y una toxicidad similares a las del MeHg. La exposición humana al EtHg se debe principalmente a la presencia y descomposición del timerosal, un conservante a base de mercurio utilizado en viales multidosis de medicamentos y vacunas.<sup>118</sup>

---

<sup>115</sup> Lamborg, C.H., Hammerschmidt, C.R., Bowman, K.L., Swarr, G.J., Munson, K.M., Ohnemus, D.C., Lam, P.J., Heimbürger, L., Rijkenberg, M.J.A., Saito, M.A., 2014. A global ocean inventory of anthropogenic mercury based on water column measurements. *Nature* 512, 65–68

<sup>116</sup> Fitzgerald, W. F., Lamborg, C. H., Hammerschmidt, C. R., 2007. Marine biogeochemical cycling of mercury. *Chemical reviews*, 107(2), 641-662.

<sup>117</sup> Díez, S., 2009. Human health effects of methylmercury exposure. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 111-132.

<sup>118</sup> Trümpler, S., Meermann, B., Nowak, S., Buscher, W., Karst, U., Sperling, M., 2014. In vitro study of thimerosal reactions in human whole blood and plasma surrogate samples. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(2), 125-130.

Actualmente, la mayoría de los estudios sobre la exposición humana al Hg se limitan a las concentraciones totales del metal.<sup>119</sup> Sin embargo, el estudio de la distribución de las especies de Hg en biomarcadores como la sangre, el pelo y la orina, es una herramienta única para evaluar las fuentes de exposición y comprender la dinámica y la bioacumulación del Hg en los seres humanos.<sup>105</sup>

El método de por excelencia para la determinación de los compuestos de Hg en muestras biológicas complejas es la dilución isotópica combinada con la espectrometría de masas (IDMS), haciendo uso de GC-ICP-MS.<sup>51</sup> Esta estrategia no sólo proporciona las ventajas propias de los equipos de ICP-MS (alta selectividad, sensibilidad y tolerancia a la matriz)<sup>120,121,122</sup>, sino también la posibilidad de utilizar trazadores múltiples para corregir la interconversión entre las especies de Hg a lo largo del procedimiento de preparación de la muestra<sup>123,124</sup>.

Trabajos previos ya habían dejado clara la importancia del uso de trazadores múltiples en el análisis de especiación del Hg para la obtención de resultados exactos y precisos, ya que se ha demostrado que las reacciones de transformación entre las especies son fuertemente dependientes de la matriz de la muestra y de

---

<sup>119</sup> Berglund, M., Lind, B., Björnberg, K. A., Palm, B., Einarsson, Ö., Vahter, M., 2005. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. *Environmental Health*, 4, 1-11.

<sup>120</sup> Qvarnström, J., Lambertsson, L., Havarinasab, S., Hultman, P., Frech, W., 2003. Determination of methylmercury, ethylmercury, and inorganic mercury in mouse tissues, following administration of thimerosal, by species-specific isotope dilution GC- inductively coupled plasma-MS. *Analytical chemistry*, 75(16), 4120-4124.

<sup>121</sup> Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C., Krupp, E., Amouroux, D., Donard, O. F. X., 2002. Application of isotopically labeled methylmercury for isotope dilution analysis of biological samples using gas chromatography/ICPMS. *Analytical chemistry*, 74(11), 2505-2512.

<sup>122</sup> Yang, L., Mester, Z., Sturgeon, R. E., 2003. Determination of methylmercury in fish tissues by isotope dilution SPME-GC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18(5), 431-436.

<sup>123</sup> Hintelmann, H., & Evans, R. D., 1997. Application of stable isotopes in environmental tracer studies—Measurement of monomethylmercury (CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>) by isotope dilution ICP-MS and detection of species transformation. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 358, 378-385.

<sup>124</sup> Monperrus, M., Rodríguez Gonzalez, P., Amouroux, D., Garcia Alonso, J. I., Donard, O. F., 2008. Evaluating the potential and limitations of double-spiking species-specific isotope dilution analysis for the accurate quantification of mercury species in different environmental matrices. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 390, 655-666.

los protocolos de extracción y derivatización.<sup>110</sup> Son varios los trabajos publicados sobre la determinación de Hg(II), MeHg y EtHg por IDMS con triple trazador y GC-ICP-MS<sup>110,125,126</sup> aunque, la técnica ICP-MS se aplica generalmente de manera rutinaria para el análisis de Hg total, mientras que la determinación de compuestos organometálicos se realiza normalmente por GC-(EI)-MS, debido a su menor coste de adquisición y mantenimiento.

La aplicación de IDMS para la especiación de Hg utilizando una fuente EI es bastante más compleja que utilizando una fuente ICP, particularmente cuando se utilizan trazadores múltiples. Hace años, en el grupo de investigación donde se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral, ya se había conseguido aplicar la IDMS con trazador múltiple para la determinación de Hg(II) y MeHg en materiales de referencia de pescado, usando un equipo de GC-(EI)-MS<sup>127</sup>, y para la determinación de compuestos butilados de estaño, utilizando un equipo de GC-(EI)-MS/MS<sup>128</sup>. La comparación de GC-ICP-MS y GC-(EI)-MS para la determinación de Hg(II) y MeHg mediante la IDMS con un único trazador también se ha realizado anteriormente, obteniéndose resultados de precisión y exactitud similares para ambas técnicas, aunque con peores límites de detección y

---

<sup>125</sup> Davis, W. C., Long, S. E., 2011. Measurements of methylmercury, ethylmercury, and inorganic mercury species in a whole blood standard reference material: SRM 955c—Toxic Elements in Caprine Blood. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 26(2), 431-435.

<sup>126</sup> Sommer, Y. L., Verdon, C. P., Fresquez, M. R., Ward, C. D., Wood, E. B., Pan, Y., Caldwell, K. L. Jones, R. L. 2014. Measurement of mercury species in human blood using triple spike isotope dilution with SPME-GC-ICP-DRC-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406, 5039-5047.

<sup>127</sup> Castillo, A., Rodríguez-Gonzalez, P., Centineo, G., Roig-Navarro, A. F., Alonso, J. I. G., 2010. Multiple spiking species-specific isotope dilution analysis by molecular mass spectrometry: simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in fish tissues. *Analytical chemistry*, 82(7), 2773-2783.

<sup>128</sup> Rodríguez-Cea, A., Rodríguez-González, P., Cardona, N. F., Mares, J. L. A., Nebot, S. B., Alonso, J. I. G. 2015. Determination of ultratrace levels of tributyltin in waters by isotope dilution and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1425, 265-272.

cuantificación para GC-(EI)-MS.<sup>129,130,131</sup> Hasta la fecha, la comparación de las tres técnicas de medida utilizando la IDMS con trazadores múltiples para la especiación de Hg no se ha llevado a la práctica.

### D.1.2. Objetivos

En este capítulo se comparan GC-ICP-MS, GC-(EI)-MS y GC-(EI)-MS/MS para la determinación de Hg(II), MeHg y EtHg por medio de IDMS con triple trazador. Este objetivo general se dividió en los siguientes objetivos parciales:

- Optimización de los principales parámetros experimentales que afectan a la medida de la distribución isotópica de las especies de Hg por GC-(EI)-MS y GC-(EI)-MS/MS.
- Análisis de CRM (DOLT-4 (hígado de pez perro), IAEA-085 (pelo humano), IAEA-086 (pelo humano) y SRM-955c (sangre de cabra)) por GC-ICP-MS, GC-(EI)-MS y GC-(EI)-MS/MS y comparación de los resultados obtenidos.
- Determinación de los límites de detección y cuantificación a través de la medida de blancos de procedimiento por GC-ICP-MS, GC-(EI)-MS y GC-(EI)-MS/MS y comparación de los valores obtenidos.

---

<sup>129</sup> Hippler, J., Hoppe, H. W., Mosel, F., Rettenmeier, A. W., & Hirner, A. V., 2009. Comparative determination of methyl mercury in whole blood samples using GC-ICP-MS and GC-MS techniques. *Journal of Chromatography B*, 877(24), 2465-2470.

<sup>130</sup> Cavalheiro, J., Preud'homme, H., Amouroux, D., Tessier, E., Monperrus, M., 2014. Comparison between GC-MS and GC-ICPMS using isotope dilution for the simultaneous monitoring of inorganic and methyl mercury, butyl and phenyl tin compounds in biological tissues. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406, 1253-1258.

<sup>131</sup> Nevado, J. B., Martín-Doimeadios, R. R., Krupp, E. M., Bernardo, F. G., Fariñas, N. R., Moreno, M. J., ... & Roperó, M. P., 2011. Comparison of gas chromatographic hyphenated techniques for mercury speciation analysis. *Journal of Chromatography A*, 1218(28), 4545-4551.

### D.1.3. Experimental

#### D.1.3.1. Instrumentación

Los equipos utilizados a lo largo de este capítulo han sido comentados en la sección **C.1.** del Experimental General.

En lo que respecta a los equipos utilizados para la preparación de las muestras y los patrones:

Para la digestión básica de las muestras se utilizó un microondas Explorer Hybrid de CEM Corporation (Matthews, NC, EE.UU.). La centrifugación de las muestras ya derivatizadas se realizó utilizando una centrífuga modelo CENTRO-8 BL (JP Selecta, Barcelona, España). La preparación gravimétrica de muestras y patrones se realizó con una balanza analítica Mettler Toledo MS Semi-micro MA 205DU (Zurich, Suiza). El pH se ajustó con un pH-metro CRISON Basic 20 (Alella, Barcelona, España). Se usó un evaporador Mini-Vap (Supelco, Bellefonte PA) para preconcentrar las muestras bajo una corriente de nitrógeno.

En lo que respecta a los equipos utilizados en la de medida de las muestras y los patrones:

Se acopló un cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Agilent Technologies, Tokio, Japón) equipado con un inyector *split/splitless* y una columna capilar DB-5MS de Agilent J&W Scientific (5% difenilo, 95% dimetilsiloxano, 30 m x 0,53 mm de diámetro interno, 0,1  $\mu\text{m}$  de espesor de la fase estacionaria) a un ICP-MS Agilent 7500ce utilizando una línea de transferencia casera. También se utilizó un ICP-MS Agilent 7900ce, acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent 7890A (Agilent Technologies, Tokio, Japón) para la determinación de los valores de los blancos y la comparación de los límites de detección. Los análisis por GC-(EI)-MS y GC-(EI)-MS/MS se realizaron con un cromatógrafo de gases modelo 7890 (Agilent Technologies) equipado con un inyector *split/splitless*, acoplado a un

espectrómetro de masas Agilent 7000C de triple cuadrupolo. Para la separación cromatográfica de los compuestos de Hg se utilizó una columna capilar DB-5MS (reticulada 5% fenil-metil siloxano, 30 m x 0,25 mm d.i., revestimiento de 0,25 mm). Se acopló un tubo de sílice fundida (1,2 m x 180 mm x 0 mm de revestimiento) a la columna cromatográfica y se conectó al espectrómetro de masas, lo que permitió al instrumento funcionar en el modo de *back-flush*, sin perturbar el vacío. Los principales parámetros instrumentales ya han sido resumidos en la **Tabla 6** y **Tabla 8** del Experimental General.

### D.1.3.2. Reactivos y materiales

El material y los reactivos utilizados están recogidos en la sección **C.2.** del Experimental General. En este primer capítulo, se utilizaron cuatro materiales de referencia certificados: dos materiales de pelo humano (IAEA-085 y IAEA-086), un material de hígado de pescado (DOLT-4) y un material de sangre de cabra (NIST 955c Nivel 4). Para la determinación de las especies de Hg se usaron tres patrones enriquecidos Me<sup>201</sup>Hg, Et<sup>198</sup>Hg y <sup>199</sup>Hg(II) adquiridos en ISC-Science S.L. (Oviedo, España). Los compuestos se propilaron utilizando una disolución al 2% en volumen de tetra-n-propilborato de sodio.

### D.1.3.3. Procedimientos

Tanto el procedimiento experimental seguido para la preparación de las muestras, como los procedimientos utilizados para la medida de la distribución isotópica del MeHg, EtHg y Hg(II) han sido detallados en los apartados **C.3.2.**, **C.3.5.** y **C.3.6.** de la sección procedimientos del Experimental General.

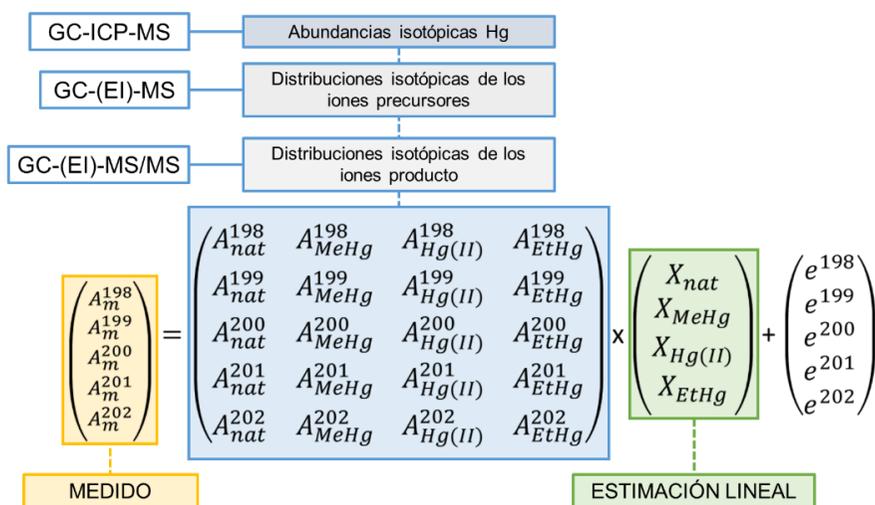
De manera resumida:

Se pesaron las masas óptimas de cada una de las muestras (0.15 g de sangre, 0.1 g de pelo y pescado) y se añadieron los trazadores isotópicos enriquecidos de las tres especies (Me<sup>201</sup>Hg, Et<sup>198</sup>Hg, <sup>199</sup>Hg(II)). Posteriormente, las muestras se

digirieron en el microondas de ondas focalizadas, a una potencia fija de 75 W durante 4,5 min, tras la adición de 3 mL de TMAH al 25%. Una vez se ajustó el pH a 4, las muestras se derivatizaron con tetra-n-etilborato de sodio al 2% en volumen.

La medida de la distribución isotópica de las tres especies de Hg se realizó por un lado con el equipo GC-ICP-MS y por otro con el equipo GC-(EI)-MS/MS en los modos SIM y SRM.

La cuantificación de los compuestos por IDMS con triple trazador se realizó aplicando las ecuaciones descritas en la sección **C.3.5.3.** para doble trazador, pero modificadas para las tres especies. De manera breve, las abundancias isotópicas experimentales de cada compuesto de mercurio ( $A_m^{xxx}$ ) se expresaron como una combinación lineal de la composición isotópica de los diferentes constituyentes de la mezcla (**Figura 33**).



**Figura 33.** Combinación lineal de la composición isotópica de los diferentes constituyentes de una mezcla de abundancia natural de Hg y tres trazadores isotópicos enriquecidos ( $Me^{201}Hg, Et^{198}Hg, ^{199}Hg(II)$ ).

Aplicando la regresión lineal múltiple se calcularon las fracciones molares de abundancia natural ( $X_{\text{nat}}$ ) y de los compuestos isotópicamente enriquecidos ( $X_{\text{MeHg}}$ ,  $X_{\text{Hg(II)}}$  y  $X_{\text{EtHg}}$ ) para cada uno de los picos cromatográficos. Cuando se trabaja con GC-(EI)-MS (modo SIM) o con GC-(EI)-MS/MS (modo SRM), se miden las distribuciones isotópicas de los iones precursores y producto, respectivamente, en lugar de las abundancias isotópicas de Hg medidas directamente por GC-ICP-MS. En estos casos, las distribuciones isotópicas teóricas de los diferentes trazadores deben calcularse.

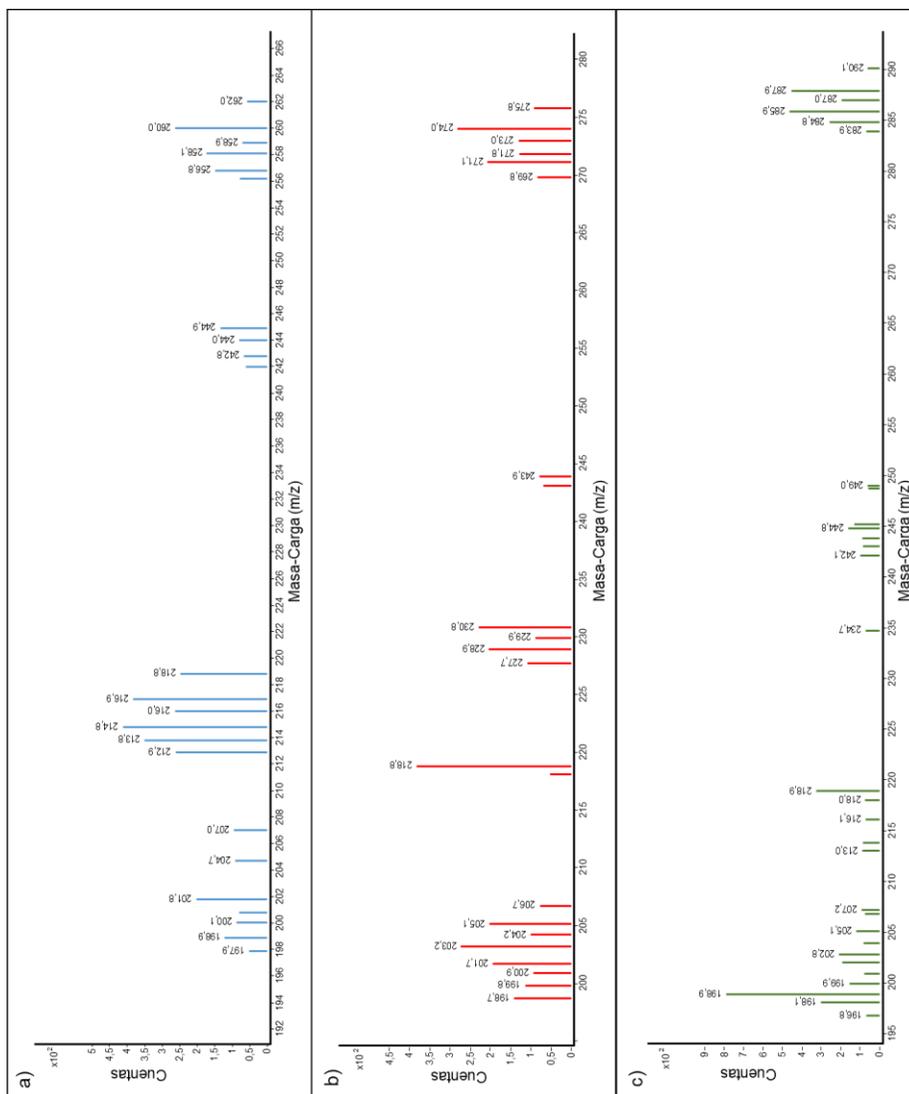
Este procedimiento permite determinar el contenido de MeHg, EtHg y Hg(II) natural en la muestra, corregido por las posibles reacciones de interconversión que se producen durante el proceso analítico. Además, también permite calcular el alcance de dichas reacciones de interconversión. De acuerdo con estudios previos realizados en el grupo de investigación, las reacciones de degradación de MeHg y EtHg son las más importantes.<sup>110</sup>

### D.1.4. Resultados y discusión

#### D.1.4.1. Medida de las distribuciones isotópicas por GC-(EI)-MS

La medida precisa de las distribuciones isotópicas de moléculas orgánicas con equipos de fuente EI requiere la corrección de la adición o pérdida de átomos de hidrógeno del clúster molecular medido. Además, cuando se utilizan analizadores de masa de tipo cuadrupolo la falta de resolución espectral hace que exista un solapamiento espectral a masa  $M-1$  que debe tenerse en cuenta.

En la **Figura 34** se muestran los espectros de masas obtenidos en modo SCAN de los tres analitos propilados  $\text{MeHgPr}^+$ ,  $\text{EtHgPr}^+$  y  $\text{HgPr}^{2+}$ . Se pueden observar varios clústeres, correspondientes a los iones moleculares y la pérdida sucesiva de grupos alquilo para los tres compuestos. Sin embargo, solo se observa una concordancia razonable entre las distribuciones isotópicas experimentales y teóricas en el caso de los iones moleculares.



**Figura 34.** Espectros de masas de una mezcla de patrones naturales propilados de los tres compuestos de mercurio en modo SCAN: a) MeHgPr<sup>+</sup>; b) EtHgPr<sup>+</sup>; c) HgPr<sup>2+</sup>.

Por esto, y basándonos en resultados anteriores,<sup>127</sup> nos centramos en la pureza espectral de los clústeres de los iones moleculares para medir las abundancias de las distribuciones isotópicas en el modo SIM. Como se describió anteriormente, las abundancias experimentales se expresaron como una combinación lineal de las abundancias teóricas de las distribuciones de los isotopólogos M, M+H, M-1 y M-2. La contribución de M+H y M-2 resultó ser despreciable para las tres

## Resultados

---

especies propiladas, por lo que las abundancias experimentales se expresaron finalmente como una combinación lineal de M y M-1.

La **Tabla 10** muestra que la pureza del ion molecular fue superior al 98,95% para las tres especies de mercurio, confirmando los resultados obtenidos previamente.<sup>127</sup> La única interferencia espectral relevante fue la de la masa M-1, siendo su contribución al ión molecular de en torno al 1%.

**Tabla 10.** Pureza espectral de los clústeres de los iones moleculares para las tres especies de mercurio propiladas. Las contribuciones (%) de M y M-1 a los espectros experimentales se calcularon mediante regresión lineal múltiple como se ha descrito anteriormente.<sup>132</sup> Las incertidumbres corresponden con las desviaciones estándar de n=5 inyecciones en GC-(EI)-MS de un patrón de abundancia natural.

	M	M-1
<b>MeHgPr+</b>	98,55 ± 0,68	1,57 ± 0,69
<b>EtHgPr+</b>	98,84 ± 0,55	1,25 ± 0,57
<b>HgPr2+</b>	98,82 ± 0,37	1,30 ± 0,38

Utilizando los valores de la **Tabla 10**, junto con el enriquecimiento isotópico de Hg de los compuestos marcados calculado previamente por GC-ICP-MS<sup>110</sup> y el algoritmo propuesto por Kubinyi<sup>111</sup>, se calcularon las distribuciones isotópicas teóricas para los analitos propilados naturales y marcados, que se presentan en la **Tabla 11**. Además de las distribuciones isotópicas de los compuestos marcados añadidos a la muestra, se calcularon las distribuciones para los productos de las posibles reacciones de interconversión que tienen lugar durante el procedimiento

---

<sup>132</sup> González-Antuña, A., Rodríguez-González, P., García Alonso, J. I., 2014. Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 49(8), 681-691.

de preparación de la muestra. Por ejemplo, es posible que el metilmercurio enriquecido con  $^{201}\text{Hg}$  pierda parcialmente el grupo metilo durante la preparación de la muestra, convirtiéndose en  $\text{Hg(II)}$ . Entonces, tras la propilación, se derivatizará a  $\text{Pr}_2\text{Hg}$  enriquecido en  $^{201}\text{Hg}$  con una distribución isotópica diferente a la del  $\text{MePrHg}$  enriquecido en  $^{201}\text{Hg}$ . Para determinar con precisión las concentraciones de mercurio y el alcance de las reacciones de interconversión, deben tenerse en cuenta estas posibilidades.

## Resultados

**Tabla 11.** Distribuciones isotópicas teóricas de los clústeres moleculares para los compuestos de mercurio de abundancia natural y marcados propilados, calculadas mediante el algoritmo propuesto por Kubinyi.<sup>111</sup> En la tabla se recogen también las distribuciones isotópicas experimentales obtenidas por GC-ICP-MS para el mercurio.

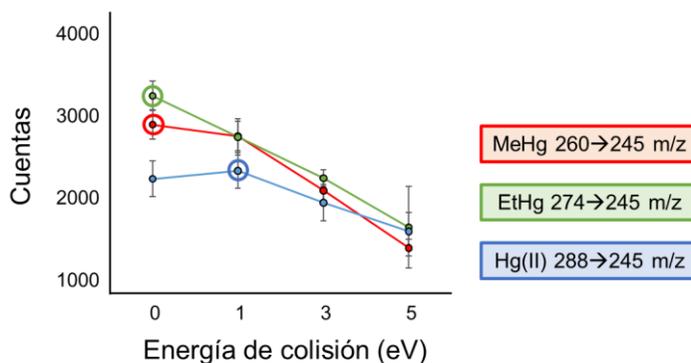
	m/z	Natural	<sup>201</sup> MeHg	<sup>198</sup> EtHg	<sup>199</sup> Hg(II)
<b>MePrHg<sup>+</sup></b>	256	0,095	0,001	0,922	0,013
	257	0,166	0,001	0,053	0,861
	258	0,228	0,010	0,007	0,083
	259	0,136	0,919	0,005	0,013
	260	0,291	0,066	0,007	0,022
<b>EtPrHg<sup>+</sup></b>	270	0,094	0,001	0,912	0,013
	271	0,165	0,001	0,063	0,851
	272	0,228	0,010	0,007	0,092
	273	0,137	0,910	0,005	0,014
	274	0,290	0,075	0,007	0,021
<b>Pr<sub>2</sub>Hg<sup>+</sup></b>	284	0,093	0,001	0,902	0,013
	285	0,164	0,001	0,072	0,842
	286	0,227	0,010	0,008	0,100
	287	0,138	0,900	0,005	0,015
	288	0,288	0,085	0,007	0,021
<b>Hg<sup>+</sup> (ICP-MS)</b>	198	0,100	0,001	0,982	0,013
	199	0,169	0,001	0,002	0,909
	200	0,231	0,010	0,004	0,042
	201	0,132	0,961	0,004	0,010
	202	0,299	0,026	0,005	0,019

### D.1.4.2. Medida de las distribuciones isotópicas por GC-(EI)-MS/MS

Cuando se trabaja con MS en tándem, la distribución isotópica medida para los iones fragmento, obtenidos tras la disociación inducida por colisión (CID) en la celda, no refleja su distribución isotópica teórica. Esto se debe a la contribución de varios isotopólogos de la molécula precursora al mismo isotopólogo del ion

producto. Así pues, el algoritmo propuesto por Kubinyi<sup>111</sup> no resulta ser adecuado para calcular las distribuciones isotópicas teóricas para analitos propilados de abundancia natural y marcados en MS en tándem. Alternativamente, la distribución isotópica de los iones de fragmento medidos por SRM puede predecirse utilizando un software adecuado, como IsoPatrn©.<sup>113</sup>

Se seleccionaron las transiciones SRM para cada compuesto de Hg correspondientes a la pérdida de un grupo alquilo (Me, Et o Pr), siendo el fragmento  $\text{HgPr}^+$  común para todas las especies. La energía de colisión se optimizó aplicando energías de 0 a 5 eV, siendo 0 eV la energía óptima para EtHg y MeHg y 1 eV para Hg(II), como denota el aumento significativo de cuentas de la **Figura 35**.



**Figura 35.** Optimización de la energía de colisión de 0 a 5 eV. Transición MeHg: 260 → 245 m/z; Transición EtHg: 274 → 245 m/z; Transición Hg(II): 288 → 245 m/z.

El hecho de que las desviaciones estándar sean ligeramente peores para los valores obtenidos a energías de colisión menores no se consideró relevante, ya que las medidas finales corresponden a distribuciones isotópicas y no a los valores absolutos de áreas de pico. Cabe destacar que la disminución del flujo de gas de colisión de 1,5 a 0,5 mL min<sup>-1</sup> proporcionó señales más altas para los tres compuestos en las transiciones seleccionadas. Estos resultados difieren de los

## Resultados

---

publicados previamente,<sup>133</sup> obtenidos al derivatizar con NaBPh<sub>4</sub>, ya que se encontraron energías de colisión óptimas de 20 eV para el MeHg, 15 eV para el EtHg y 5 eV para el Hg(II), trabajando a 1,5 mL min<sup>-1</sup> como flujo de gas de colisión, seleccionando la m/z 77 (el grupo fenilo) como ion producto. En este trabajo, utilizando NaBPr<sub>4</sub>, se observó para todos los tres compuestos de Hg el m/z 245 como el ion producto más intenso.

Para comprobar la precisión de las medidas realizadas por masas en tándem se inyectaron patrones de abundancia natural de las tres especies de Hg, para comparar así las distribuciones experimentales obtenidas con las distribuciones isotópicas teóricas calculadas siguiendo las indicaciones de Ramaley *et al.*<sup>113</sup> La **Tabla 12** muestra la concordancia entre distribuciones isotópicas experimentales y teóricas de los iones producto para los tres compuestos de Hg teniendo en cuenta la desviación estándar calculada a partir de n=5 inyecciones GC-(EI)-MS/MS independientes.

---

<sup>133</sup> Li, J., He, Q., Wu, L., Sun, J., Zheng, F., Li, L., Liu, J., 2020. Ultrasensitive speciation analysis of mercury in waters by headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 153, 104459.

**Tabla 12.** Comparación de las distribuciones isotópicas teóricas calculadas siguiendo las indicaciones de Ramaley *et al.*<sup>113</sup> con las distribuciones experimentales obtenidas por GC-(EI)-MS/MS. La incertidumbre de los resultados corresponde a n=5 inyecciones GC-(EI)-MS/MS independientes de un patrón de abundancia natural de los tres compuestos.

	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	Distribución isotópica teórica (%)	Distribución isotópica experimental (%)
<b>MePrHg<sup>+</sup></b>	256	241	10,48	10,55 ± 0,03
	257	242	18,09	18,15 ± 0,11
	258	243	24,88	25,02 ± 0,03
	259	244	14,67	14,69 ± 0,04
	260	245	31,87	31,58 ± 0,10
<b>EtPrHg<sup>+</sup></b>	270	241	10,48	10,61 ± 0,04
	271	242	18,09	18,37 ± 0,04
	272	243	24,88	24,95 ± 0,10
	273	244	14,67	14,57 ± 0,03
	274	245	31,87	31,87 ± 0,08
<b>Pr<sub>2</sub>Hg<sup>+</sup></b>	284	241	10,48	10,66 ± 0,04
	285	242	18,09	18,41 ± 0,07
	286	243	24,88	24,96 ± 0,13
	287	244	14,67	14,56 ± 0,05
	288	245	31,87	31,41 ± 0,15

Finalmente, utilizando el enriquecimiento isotópico de Hg en las especies marcadas calculado previamente por GC-ICP-MS<sup>110</sup> y el software IsoPatrn©<sup>113</sup>, se calcularon las distribuciones isotópicas teóricas para los analitos propilados

## Resultados

naturales y marcados, tanto para los compuestos marcados de partida, como para los productos de las posibles reacciones de interconversión (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Distribuciones isotópicas teóricas para compuestos propilados de mercurio naturales y marcados de mercurio calculadas según lo descrito por Ramaley *et al.*<sup>113</sup>

	Transición MRM	Natural	<sup>201</sup> MeHg	<sup>198</sup> EtHg	<sup>199</sup> Hg(II)
	256→241	0,106	0,000	0,954	0,011
	257→242	0,182	0,002	0,034	0,890
MePrHg <sup>+</sup> → PrHg <sup>+</sup>	258→243	0,250	0,009	0,003	0,070
	259→244	0,147	0,935	0,004	0,010
	260→245	0,316	0,054	0,005	0,019
	270→241	0,106	0,000	0,952	0,011
	271→242	0,184	0,001	0,034	0,890
EtPrHg <sup>+</sup> → PrHg <sup>+</sup>	272→243	0,249	0,007	0,004	0,070
	273→244	0,146	0,940	0,004	0,010
	274→245	0,315	0,051	0,005	0,019
	284→241	0,107	0,000	0,954	0,012
	285→242	0,184	0,001	0,034	0,889
Pr <sub>2</sub> Hg <sup>+</sup> → PrHg <sup>+</sup>	286→243	0,250	0,007	0,003	0,070
	287→244	0,146	0,940	0,004	0,011
	288→245	0,314	0,051	0,005	0,018

### D.1.4.3. Comparación de los límites de detección y cuantificación

Debido a la falta de muestras libres de especies de mercurio, los valores de los blancos se obtuvieron aplicando la IDMS con triple trazador, añadiendo

cantidades adecuadas de los trazadores  $\text{Me}^{201}\text{Hg}$ ,  $^{199}\text{Hg(II)}$  y  $\text{Et}^{198}\text{Hg}$  a los blancos de procedimiento. Para el cálculo de los valores, se consideró una masa teórica de muestra de 0,5 g. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se calcularon como tres y diez veces la desviación estándar (DS) de seis blancos de procedimiento, respectivamente. Los blancos se analizaron con tres espectrómetros de masas diferentes: i) GC-(EI)-MS/MS Agilent 7000C de triple cuadrupolo en modo SIM y SRM, ii) GC Agilent 6890 acoplado a un ICP-MS Agilent 7500ce, iii) GC Agilent 7890 acoplado a un ICP-MS Agilent 7900ce.

En la **Tabla 14** se encuentran recogidos los valores de los blancos, los límites de detección y los límites de cuantificación expresados en  $\text{ng Hg g}^{-1}$ . En general, los valores de los blancos y los LD fueron inferiores a  $1 \text{ ng g}^{-1}$  para todos los compuestos de mercurio y para todas las técnicas comparadas. Como puede observarse, los LD y LC más bajos se obtuvieron generalmente mediante GC-ICP-MS. No se observaron diferencias significativas para los valores de LD y LC obtenidos con el Agilent 7500ce antiguo y con el Agilent 7900ce nuevo, lo que indica que para GC-ICP-MS, el límite de detección del método no viene condicionado por la sensibilidad instrumental. En el caso de GC-(EI)-MS y GC-(EI)-MS/MS se obtuvieron en general LD y LC más bajos mediante SIM, en comparación con el modo SRM. Esto podría deberse a un bajo rendimiento de la ruta de fragmentación seleccionada en la celda de colisión. Resumiendo, GC-ICP-MS proporcionó límites de detección tres veces más bajos para  $\text{Hg(II)}$  y  $\text{MeHg}$  que GC-(EI)-MS y entre 4 y 10 veces más bajos que GC-(EI)-MS/MS. Para el caso del  $\text{EtHg}$ , los límites de detección fueron similares tanto para GC-ICP-MS y como para GC-(EI)-MS.

Se puede concluir, por tanto, que los valores de los blancos de procedimiento y los límites de detección son lo suficientemente bajos como para poder aplicar las tres técnicas al análisis de muestras reales. Asimismo, resulta necesario realizar un análisis de materiales de referencia para evaluar el rango de aplicabilidad real

## Resultados

---

de las técnicas, ya que existen otros problemas, como las interferencias espectrales o los efectos de matriz, que podrían dificultar su empleo en algunas matrices.

**Tabla 14.** Valores de los blancos, límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) expresados como ng Hg g<sup>-1</sup>, obtenidos para Hg(II), MeHg y EtHg a partir de la determinación de n=6 blancos independientes considerando una cantidad de muestra teórica de 0,5g mediante las diferentes técnicas.

Espectrómetro de masas	Técnica	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Promedio	DS	LD	LC
<b>Hg(II)</b>	Agilent 7000C	GC-(EI)-MS	0,05	0,08	0,32	0,29	0,17	0,26	0,11	0,34	1,12
	Agilent 7000C	GC-(EI)-MS/MS	0,42	0,45	0,07	0,34	0,52	0,33	0,17	0,51	1,71
	Agilent 7500ce	GC-ICP-MS	0,1	0,09	0,19	0,14	0,17	0,14	0,04	0,12	0,39
	Agilent 7900 ce	GC-ICP-MS	0,04	0,11	0,13	0,08	0,14	0,1	0,1	0,04	0,11
<b>MeHg</b>	Agilent 7000C	GC-(EI)-MS	0,02	0,03	0,01	0,02	0,03	0,09	0,03	0,09	0,28
	Agilent 7000C	GC-(EI)-MS/MS	0,09	0,21	0,04	0,23	0,24	0,01	0,1	0,3	1,01
	Agilent 7500ce	GC-ICP-MS	0,05	0,05	0,06	0,06	0,05	0,06	0,01	0,02	0,05
	Agilent 7900 ce	GC-ICP-MS	0,09	0,1	0,1	0,11	0,09	0,1	0,1	0,01	0,02
<b>EtHg</b>	Agilent 7000C	GC-(EI)-MS	0,04	0,07	0,02	0,01	0,02	0,04	0,03	0,07	0,23
	Agilent 7000C	GC-(EI)-MS/MS	0	0	-0,06	0,19	0,08	0,07	0,05	0,26	0,86
	Agilent 7500ce	GC-ICP-MS	0,12	0,18	0,2	0,21	0,2	0,22	0,19	0,11	0,36
	Agilent 7900 ce	GC-ICP-MS	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,01	0,02

### D.1.4.4. Análisis de los materiales de referencia certificados

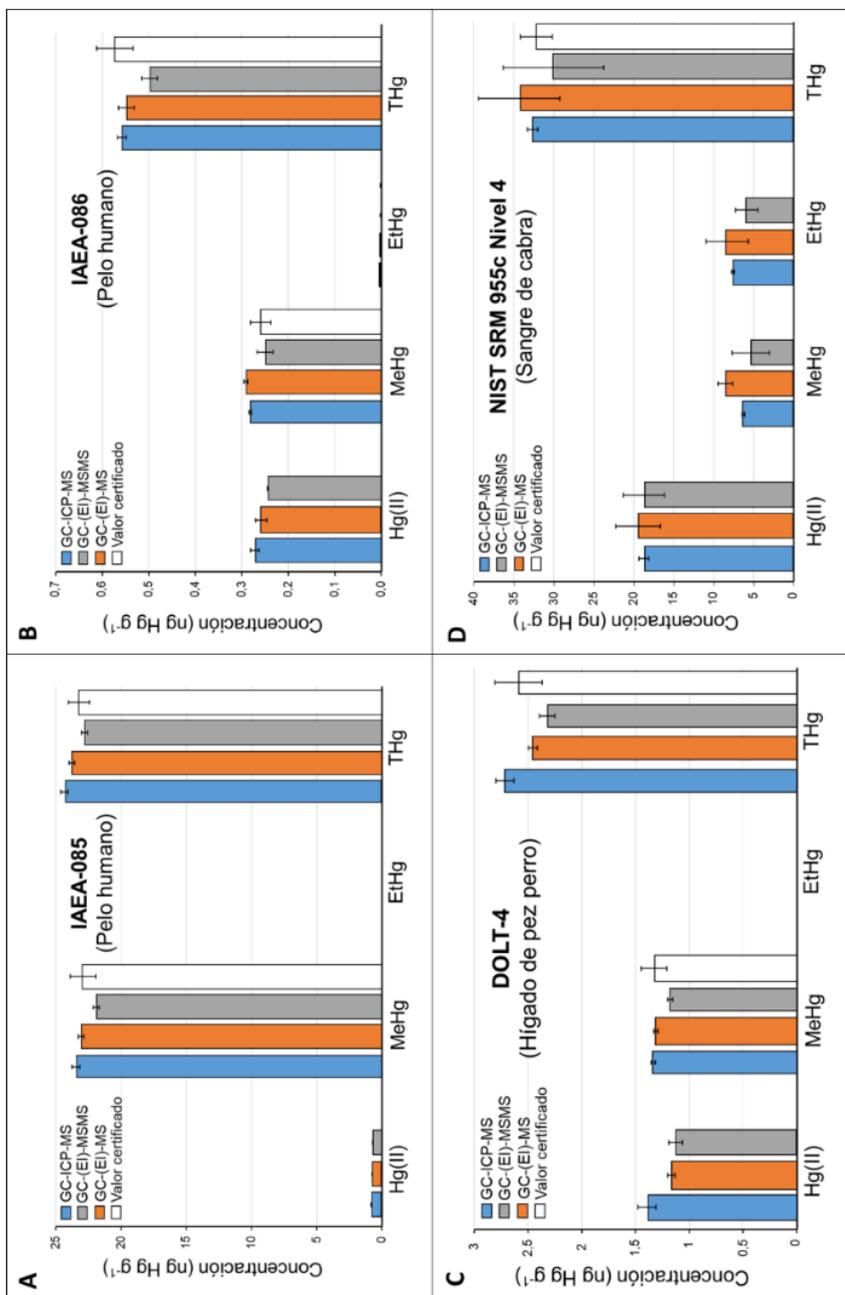
Se siguió el procedimiento de preparación de muestra explicado con detalle sección **C.3.2.** para el análisis de los materiales de referencia certificados NIST SRM 955c Nivel 4 (sangre de cabra), IAEA-085 (pelo humano), IAEA-086 (pelo humano) y DOLT-4 (hígado de pez perro).

Los materiales IAEA-085, IAEA-086 y DOLT-4 se encuentran certificados para MeHg y mercurio total (HgT) mientras que el material NIST SRM 955c nivel 4 está certificado únicamente para HgT. Sin embargo, este material de sangre de cabra también aporta valores de referencia para MeHg, EtHg y Hg(II), obtenidos a partir de la media ponderada de los datos del NIST y de laboratorios colaboradores. Los niveles 3, 2 y 1 del NIST SRM 955c solo pudieron analizarse mediante GC-ICP-MS debido a la menor sensibilidad del GC-(EI)-MS y el GC-(EI)-MS/MS. Por esto, la comparación se realizó solamente en muestras de sangre para el nivel más alto del NIST SRM 955c. La concentración del EtHg presente en el resto de los materiales es casi despreciable, por lo que, para minimizar errores en el cálculo de las concentraciones y de los factores de interconversión, se añadieron cantidades muy inferiores del trazador Et<sup>198</sup>Hg a los materiales de pelo humano y de hígado de pez perro, en comparación con las cantidades añadidas de los otros trazadores. No se detectó EtHg de abundancia natural en ninguno de estos materiales de referencia.

La **Tabla 15** y la **Figura 36** muestran los resultados obtenidos para el análisis de n=3 réplicas independientes de los materiales de referencia, donde las concentraciones de MeHg, EtHg, Hg(II) y Hg total (HgT) se expresan como  $\mu\text{g Hg g}^{-1}$  excepto para el material NIST SRM 955c ( $\text{ng Hg g}^{-1}$ ). Todos los extractos de las muestras se midieron por GC-ICP-MS, GC-(EI)-MS (modo SIM) y GC-(EI)-MS/MS (modo SRM) el mismo día.

**Tabla 15.** Resultados obtenidos en análisis de los materiales de referencia certificados NIST SRM 955c, IAEA-085, IAEA-086 y DOLT-4 por GC-ICP-MS, GC-(EI)-MS (Modo SIM) y GC-(EI)-MS/MS (Modo SRM). Las concentraciones de MeHg, EtHg, Hg(II) y Hg total (HgT) se expresan en  $\mu\text{g Hg g}^{-1}$  excepto para el NIST SRM 955c ( $\text{ng Hg g}^{-1}$ ). La incertidumbre de los valores corresponde a la desviación estándar de n=3 réplicas independientes.

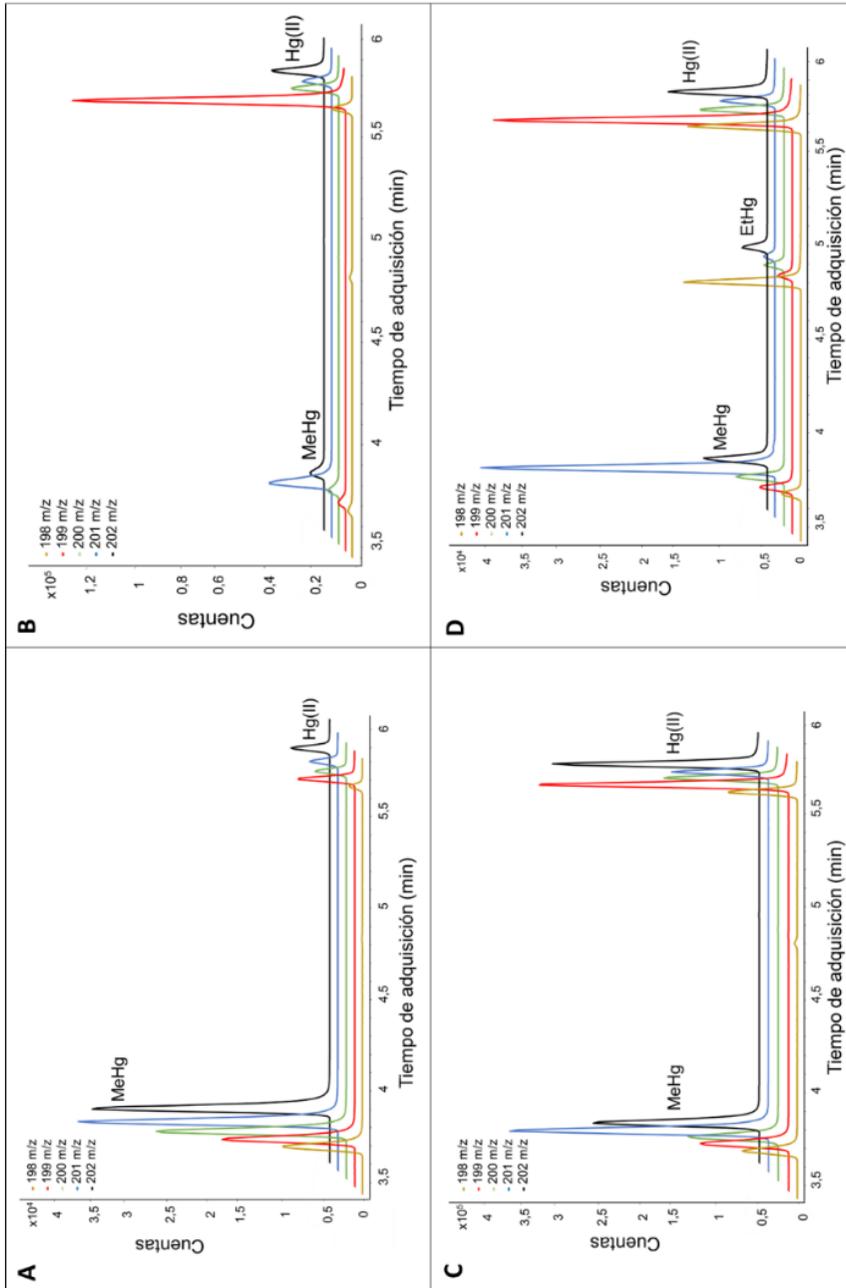
		MeHg	EtHg	Hg(II)	HgT
IAEA-085	GC-ICP-MS	23,35 ± 0,29	-	0,77 ± 0,01	24,13 ± 0,29
	GC-(EI)-MS	23,07 ± 0,21	-	0,68 ± 0,02	23,75 ± 0,22
	GC-(EI)-MSMS	21,95 ± 0,22	-	0,70 ± 0,03	22,66 ± 0,24
	Valores certificados	22,90 ± 1,00	-	-	23,20 ± 0,80
IAEA-086	GC-ICP-MS	0,28 ± 0,01	-	0,27 ± 0,01	0,56 ± 0,01
	GC-(EI)-MS	0,29 ± 0,01	-	0,26 ± 0,01	0,55 ± 0,02
	GC-(EI)-MSMS	0,25 ± 0,02	-	0,25 ± 0,00	0,50 ± 0,02
	Valores certificados	0,26 ± 0,02	-	-	0,57 ± 0,04
DOLT-4	GC-ICP-MS	1,34 ± 0,02	-	1,38 ± 0,08	2,72 ± 0,08
	GC-(EI)-MS	1,30 ± 0,02	-	1,16 ± 0,03	2,46 ± 0,04
	GC-(EI)-MSMS	1,19 ± 0,02	-	1,12 ± 0,06	2,31 ± 0,07
	Valores certificados	1,33 ± 0,12	-	-	2,58 ± 0,22
NIST SRM 955c Nivel 4	GC-ICP-MS	6,58 ± 0,16	7,36 ± 0,18	18,72 ± 0,62	32,66 ± 0,66
	GC-(EI)-MS	8,46 ± 0,89	8,50 ± 0,31	19,42 ± 2,79	34,26 ± 0,68
	GC-(EI)-MSMS	5,32 ± 2,34	5,90 ± 1,39	18,73 ± 2,58	29,96 ± 5,10
	Valores certificados	-	-	-	32,20 ± 1,99



**Figura 36.** Resultados obtenidos en el análisis de los materiales de referencia certificados A) IAEA 085 (pelo humano), B) IAEA 086 (pelo humano), C) DOLT-4 (hígado de pez perro) y D) NIST SRM 955 c Nivel 4 (sangre de cabra) por GC-ICP-MS, GC-(EI)-MS (Modo SIM) y GC-(EI)-MS/MS (Modo SRM). Las concentraciones de MeHg, EtHg, Hg(II) y Hg total (HgT) se expresan en  $\mu\text{g Hg g}^{-1}$  excepto para NIST SRM 955c ( $\text{ng Hg g}^{-1}$ ). Las barras de error se corresponden con la desviación estándar de n=3 réplicas independientes.

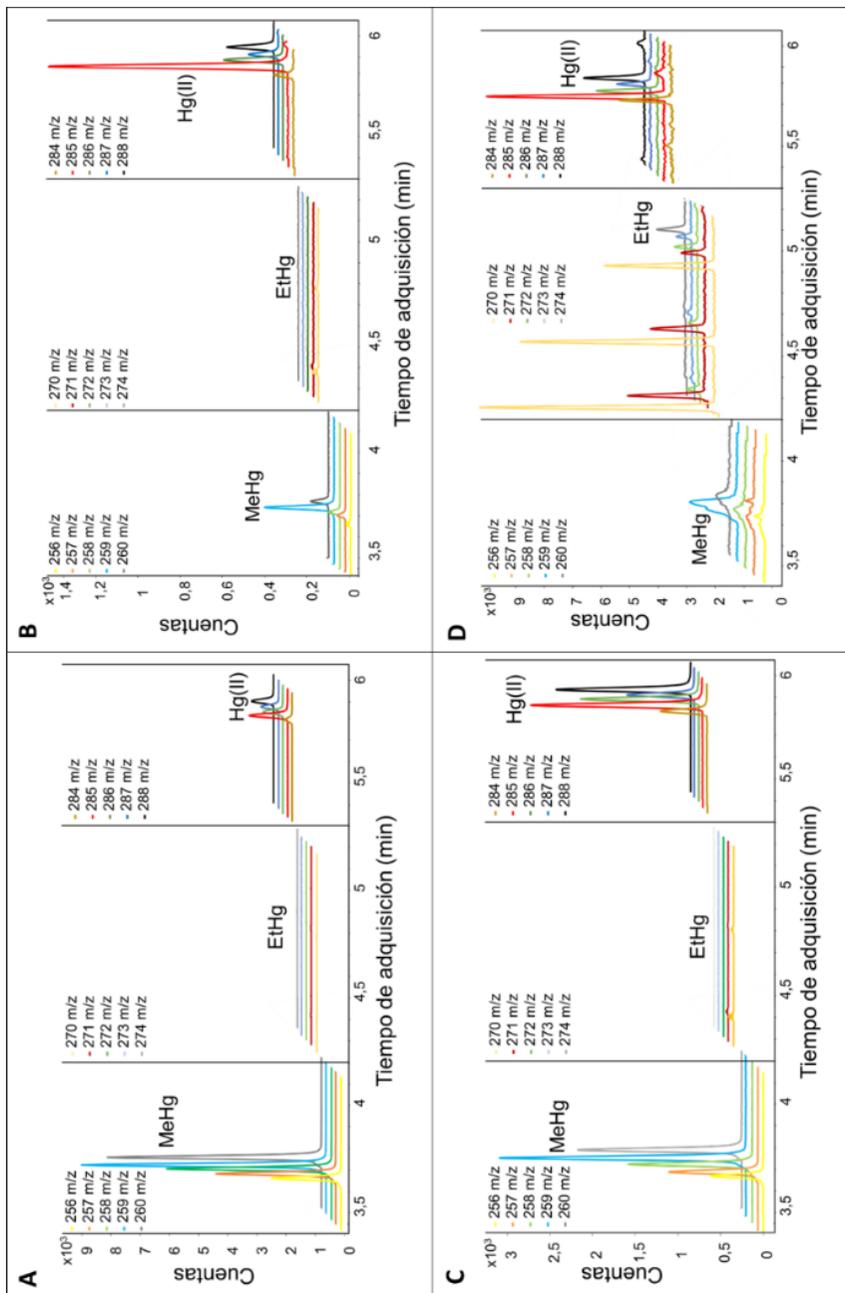
Las **Figura 37**, **Figura 38** y **Figura 39** muestran los cromatogramas de una réplica representativa de los materiales de referencia certificados realizados por GC- ICP-MS (**Figura 37**), GC-(EI)-MS (**Figura 38**) y GC-(EI)-MS/MS (**Figura 39**), respectivamente.

Como puede observarse en la **Figura 36** y en la **Tabla 15**, para los materiales de referencia de pelo humano (IAEA-085 e IAEA-086) se obtuvieron valores concordantes con los valores certificados utilizando las tres técnicas, excepto para el valor de HgT del IAEA-086, obtenido mediante GC-(EI)-MS/MS. Los cromatogramas de las **Figura 37**, **Figura 38** y **Figura 39** de estos materiales de pelo humano (cromatogramas A y B) presentan una muy buena relación señal/ruido, sin interferencias espectrales aparentes, lo que denota la idoneidad de las tres técnicas para medir Hg(II) y el MeHg en cabello humano. No obstante, bajos niveles de concentración de Hg(II) en pelo podrían resultar difíciles de medir por GC-(EI)-MS/MS (cromatograma mostrado en la **Figura 39B**). De todas formas, GC-(EI)-MS/MS en modo SIM sí que proporciona resultados satisfactorios para la especiación de mercurio en pelo humano, incluso a niveles de concentración bajos (como los del material IAEA-086).



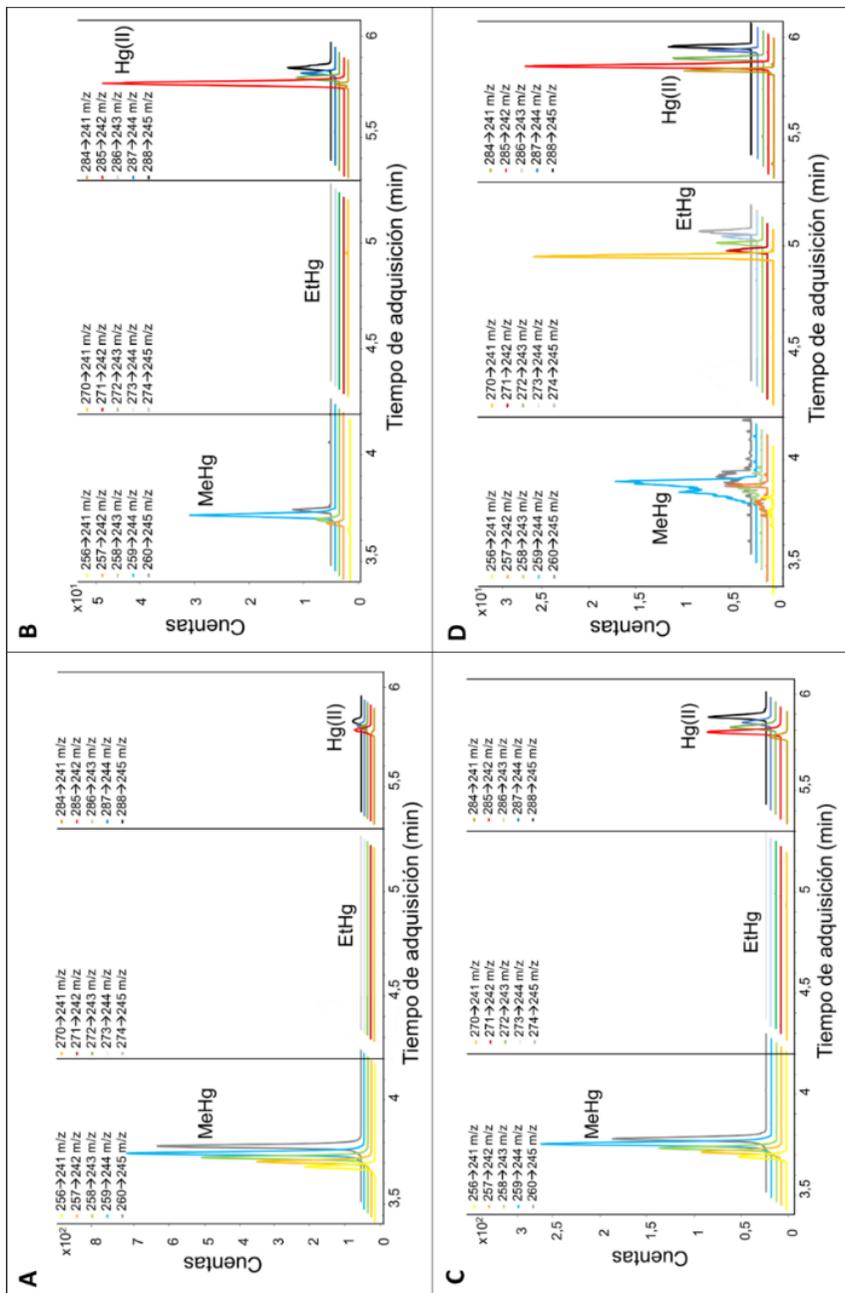
**Figura 37.** Cromatogramas GC-ICP-MS de una réplica representativa de los materiales de referencia certificados A) IAEA 085 (pelo humano), B) IAEA 086 (pelo humano), C) DOLT-4 (hígado de pez perro), D) NIST SRM 955 c Nivel 4 (sangre de cabra).

En cuanto al análisis del DOLT-4 (hígado de pez perro), tanto para GC-ICP-MS, como para GC-(EI)-MS se obtuvieron resultados acordes con los valores certificados. Por otro lado, GC-(EI)-MS/MS proporcionó resultados claramente inferiores al valor certificado para el MeHg. Teniendo en cuenta la desviación estándar de los resultados, se obtuvieron diferencias significativas entre los resultados obtenidos por GC-ICP-MS y los obtenidos por GC-(EI)-MS para el Hg(II), que lamentablemente, no está certificado en este material. Los cromatogramas mostrados en las **Figura 38C** y **Figura 39C** no reflejan ninguna interferencia espectral que afecte a la determinación de las especies de Hg por GC-(EI)-MS ni por GC-(EI)-MS/MS. Podemos asumir que los bajos valores obtenidos por GC-(EI)-MS/MS se deben a su menor sensibilidad, que afecta a la integración de las áreas de pico.



**Figura 38.** Cromatogramas GC-(EI)-MS (modo SIM) de una réplica representativa de los materiales de referencia certificados A) IAEA 085 (pelo humano), B) IAEA 086 (pelo humano), C) DOLT-4 (hígado de pez perro), D) NIST SRM 955 c Nivel 4 (sangre de cabra).

El análisis del NIST SRM 955c Nivel 4 proporcionó los resultados más interesantes. Los cromatogramas que aparecen en las **Figura 38D** y **Figura 39D** para este material muestran que la forma del pico del MeHg está distorsionada, tanto por GC-(EI)-MS, como por GC-(EI)-MS/MS, debido a interferencias espectrales no resueltas al medir el material. Estas interferencias no se observan por la detección por la GC-ICP-MS (**Figura 37D**).



**Figura 39.** Cromatogramas GC-(EI)-MS/MS (modo SRM) de una réplica representativa de los materiales de referencia certificados A) IAEA 085 (pelo humano), B) IAEA 086 (pelo humano), C) DOLT-4 (hígado de pez perro), D) NIST SRM 955 c Nivel 4 (sangre de cabra).

Además, la **Figura 38D** muestra la presencia de otros compuestos interferentes en la ventana de tiempo de adquisición del EtHg al medir el material por GC-(EI)-MS, lo que demuestra una menor selectividad de este modo de medida, en comparación con GC-(EI)-MS/MS y GC-ICP-MS. En cuanto a los valores experimentales de concentración, la **Figura 36** y la **Tabla 15** muestran diferencias significativas entre los valores de concentración obtenidos por las tres técnicas y la desviación estándar de los resultados. Los valores obtenidos por GC-ICP-MS concuerdan con resultados anteriores<sup>110</sup> y con las concentraciones certificadas y de referencia proporcionadas para el material, salvo para el valor de referencia del MeHg. Los valores obtenidos por GC-(EI)-MS y GC-(EI)-MS/MS también concuerdan con el valor certificado de HgT y los valores de referencia para Hg(II), EtHg y MeHg. Sin embargo, esta concordancia se basa en la elevada desviación estándar asociada a las medidas. Cabe señalar que los valores de EtHg y MeHg obtenidos por GC-(EI)-MS y GC-(EI)-MS/MS no concuerdan con los obtenidos por GC-ICP-MS, probablemente debido a la aparición de interferencias espectrales no resueltas o a dificultades con la integración de los picos debido a la menor sensibilidad.

#### D.1.4.5. Determinación de los factores de interconversión

La **Tabla 16** muestra el rango de los factores de interconversión (%) obtenidos en el análisis de los materiales de referencia certificados. La desmetilación del MeHg (F1) resultó ser la reacción más relevante en todos los materiales y para todas las técnicas.

Resulta también interesante comprobar la correspondencia entre los factores determinados por GC-ICP-MS y los obtenidos con las otras técnicas, ya que se inyectaron las mismas muestras. En la **Figura 40** se compara el factor de desmetilación F1 (%) obtenido por EI utilizando el modo SIM (puntos azules) y SRM (puntos naranjas) con los obtenidos por la fuente ICP para todas las muestras medidas. Como puede observarse, existe una buena correlación entre los factores

## Resultados

---

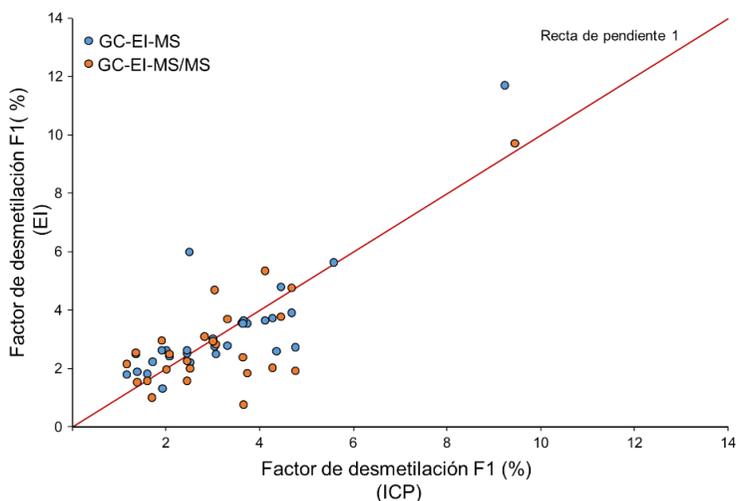
medidos por todas las técnicas. Para GC-(EI)-MS la pendiente experimental de la comparación es de 1,02 ( $r^2=0,7115$ ) mientras que para GC-(EI)-MS/MS la pendiente experimental es de 0,79 ( $r^2=0,3975$ ). Esto quiere decir que GC-(EI)-MS en modo SIM proporciona factores de desmetilación que concuerdan mejor con los obtenidos por GC-ICP-MS que los obtenidos por GC-(EI) MS/MS. Este argumento aporta más peso al uso de GC-(EI)-MS como alternativa a GC-ICP-MS en estudios de especiación de Hg. La metilación del Hg(II) (F2) resultó ser insignificante en todas las muestras.

**Tabla 16.** Rango de los factores de interconversión (%) obtenidos en el análisis de los materiales de referencia certificados NIST SRM 955c, IAEA-085, IAEA-086 y DOLT-4 mediante GC-ICP-MS, GC-EI-MS (Modo SIM) y GC-EI-MS/MS (Modo SRM). Los factores F3 a F6 relativos al EtHg son solo relevantes para el material NIST SRM 955c.

NIST SRM 955c Nivel 4												
DOLT-4			IAEA-086			IAEA-085						
	GC-(E)-MS/MS	GC-(E)-MS	GC-(E)-MSMS	GC-(E)-ICP-MS	GC-(E)-MS	GC-(E)-ICP-MS	GC-(E)-MS/MS	GC-(E)-MS	GC-(E)-ICP-MS	GC-(E)-MS/MS	GC-(E)-MS	
<b>F1</b>												
<b>MeHg → Hg(II)</b>	-2,3-9,7	2,6-11,7	-0,1-5,3	1,7-4,8	1,0-4,8	1,7-4,8	-0,2-4,7	2,2-3,6	2,5-3,7	1,5-3,0	1,8-2,5	1,2-2,5
<b>F2</b>												
<b>Hg(II) → MeHg</b>	0,0-1,6	-1,1-0,98	-4,0-1,8	0,0-2,8	-3,4- -1,3	0,0-2,8	-1,7-0,9	1,7-0,7	-0,5-0,0	-3,3-7,9	-3,5 - -0,1	-2,2-2,7
<b>F3</b>												
<b>EtHg → Hg(II)</b>	45,6-71,7	35,1-65,7	28,5-68,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>F4</b>												
<b>Hg(II) → EtHg</b>	0,0-0,3	-0,1-1,2	-0,1-0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>F5</b>												
<b>MeHg → EtHg</b>	0,1-0,9	0,0-0,8	-0,1-0,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>F6</b>												
<b>EtHg → MeHg</b>	-1,1-3,0	-0,4- -5,5	-0,1-0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## Resultados

Los factores en los que interviene el etilmercurio (F3, F4, F5 y F6) solo pueden medirse con precisión cuando a las muestras se les ha añadido  $\text{Et}^{198}\text{Hg}$  al mismo nivel que el resto de los trazadores. Por lo tanto, en la **Tabla 16** solo se dan los resultados para el NIST SRM 955c. La reacción de desalquilación del EtHg para producir Hg(II) durante la preparación de la muestra en sangre resultó ser significativa, lo que concuerda con los resultados de trabajos anteriores.<sup>110</sup> Se obtuvieron valores altos del factor F3 con todas las técnicas. Además, y coincidiendo también con los resultados de estudios previos<sup>110</sup>, las reacciones de etilación de Hg(II) (F4) y de transalquilación de MeHg-EtHg (F5 y F6) fueron insignificantes.



**Figura 40.** Comparación de los factores de desmetilación F1 (%) obtenidos por EI utilizando el modo SIM (puntos azules) y SRM (puntos naranjas) con los obtenidos por ICP.

### D.1.5. Conclusiones

En este capítulo se ha comparado el comportamiento analítico de tres técnicas de espectrometría de masas para la determinación de EtHg, MeHg y Hg(II) en varios materiales de referencia certificados.

En general, GC-ICP-MS resultó ser superior a las otras dos técnicas en términos de exactitud, precisión, límites de detección y tolerancia a la matriz. GC-(EI)-MS proporcionó resultados acordes con los valores certificados para los materiales de referencia de pelo y de hígado de pez perro. El análisis de matrices más complejas, como la sangre de cabra, por medio de la espectrometría de masas molecular a niveles de concentración más bajos, mostró limitaciones a la hora de proporcionar resultados exactos y precisos. No pudieron resolverse las interferencias espectrales en el análisis del SRM 955c por GC-(EI)-MS ni por GC-(EI)-MS/MS. La determinación del grado de desmetilación del metilmercurio mostró buena concordancia entre GC-ICP-MS y GC-(EI)-MS en modo SIM.

Basándonos en los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda el uso de GC-ICP-MS en combinación con la IDMS con múltiple trazador para la determinación de las especies de Hg en muestras de sangre, mientras que GC-(EI)-MS podría ser una alternativa "barata" para el análisis de muestras de pelo humano y pescado. No se recomienda el uso rutinario de GC-(EI)-MS/MS en modo SRM ya que, a pesar de ofrecer una mayor selectividad, presenta una menor sensibilidad con respecto al modo SIM, por lo que sus características analíticas no mejoran.



## **D.2. CAPÍTULO II**

**Determinación de metilmercurio y mercurio inorgánico en muestras de pelo humano por dilución isotópica con trazador doble y GC-ICP-MS**



### D.2.1. Introducción

En la época actual, la principal fuente de liberación de Hg al medio ambiente son las emisiones de carácter antropogénico.<sup>134</sup> Durante el siglo XIX e íntimamente relacionado con la industrialización,<sup>135</sup> las emisiones de Hg comenzaron a aumentar, alcanzándose concentraciones atmosféricas hasta cuatro veces superiores a los niveles naturales previos.<sup>136</sup> Las emisiones asociadas a la minería artesanal a pequeña escala (MAPE) de oro representan casi el 38% de la liberación total de Hg a la biosfera.<sup>137</sup>

En el transcurso de las actividades de la MAPE se forma una amalgama mediante la mezcla de Hg y oro. Posteriormente, esta amalgama se calienta, como se muestra en la **Figura 41**, para extraer el oro atrapado, liberando así vapores de Hg al aire y, por tanto, exponiendo a los mineros y a los habitantes de las zonas vecinas.<sup>138,139</sup>

Tal y como ya se venía comentando, una vez que el Hg llega a los sistemas acuáticos, una pequeña fracción es convertida por bacterias en MeHg.<sup>140</sup> Más

---

<sup>134</sup> Selin, N. E., 2009. Global biogeochemical cycling of mercury: a review. *Annual review of environment and resources*, 34, 43-63.

<sup>135</sup> Esbrí, J. M., López-Berdonces, M. A., Fernández-Calderón, S., Higuera, P., Díez, S., 2015. Atmospheric mercury pollution around a chlor-alkali plant in Flix (NE Spain): An integrated analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 4842-4850.

<sup>136</sup> Outridge, P. M., Mason, R. P., Wang, F., Guerrero, S., Heimbürger-Boavida, L. E., 2018. Updated global and oceanic mercury budgets for the United Nations Global Mercury Assessment 2018. *Environmental science & technology*, 52(20), 11466-11477.

<sup>137</sup> UN-Environment. Global Mercury Assessment 2018. United Nation Environmental Programme, Chemicals and Health Branch, Programme Chemicals and Health Branch Geneva Switzerland, 2019; [www.unenvironment.org/resources/publication/global-mercury-assessment-2018](http://www.unenvironment.org/resources/publication/global-mercury-assessment-2018).

<sup>138</sup> Telmer, K. H., Veiga, M. M., 2009. World emissions of mercury from artisanal and small scale gold mining. In *Mercury fate and transport in the global atmosphere: emissions, measurements and models*. Boston, MA: Springer US (pp. 131-172).

<sup>139</sup> UNEP, 2013. Technical Background Report for the Global Mercury Assessment. *Arct. Monit. Assess. Program*. 263.

<sup>140</sup> Marrugo-Negrete, J., Pinedo-Hernández, J., Díez, S., 2015. Geochemistry of mercury in tropical swamps impacted by gold mining. *Chemosphere* 134, 44-51.

## Resultados

---

adelante, el MeHg penetra en la cadena trófica<sup>141</sup>, biomagnificándose y bioacumulándose<sup>142</sup>, por lo que el consumo de pescado o marisco contaminado también compromete la salud humana.<sup>143</sup>



**Figura 41.** Proceso de “quema” de una amalgama de Hg y oro.

Muchos países de Sudamérica, África y Asia practican la MAPE.<sup>144</sup> De entre todos, Colombia destaca por tener los mayores índices de contaminación de Hg *per cápita*, debido al elevado uso del metal entre la población rural en las tareas de extracción de oro.<sup>145</sup> A este grave problema ambiental se suman otros, como la quema de biomasa y la deforestación. Los bosques actúan como depósitos de metales y cuando se queman, el Hg y otros contaminantes vuelven a entrar en circulación. Esto resulta de especial importancia en las regiones amazónicas, ya

---

<sup>141</sup> Outridge, P. M., Mason, R. P., Wang, F., Guerrero, S., Heimbürger-Boavida, L. E., 2018. Updated global and oceanic mercury budgets for the United Nations Global Mercury Assessment 2018. *Environmental science & technology*, 52(20), 11466-11477.

<sup>142</sup> Fuentes-Gandara, F., Herrera-Herrera, C., Pinedo-Hernandez, J., Marrugo-Negrete, J., Díez, S., 2018. Assessment of human health risk associated with methylmercury in the imported fish marketed in the Caribbean. *Environ. Res.* 165, 324–329.

<sup>143</sup> Calao-Ramos, C., Bravo, A. G., Paternina-Urbe, R., Marrugo-Negrete, J., Díez, S., 2021. Occupational human exposure to mercury in artisanal small-scale gold mining communities of Colombia. *Environment international*, 146, 106216.

<sup>144</sup> Strode, S., Jaegl'e, L., Selin, N.E., 2009. Impact of mercury emissions from historic gold and silver mining: global modeling. *Atmos. Environ.* 43, 2012–2017

<sup>145</sup> Cordy, P., Veiga, M.M., Salih, I., Al-Saadi, S., Console, S., Garcia, O., Mesa, L.A., Velasquez-López, P.C., Roeser, M., 2011. Mercury contamination from artisanal gold mining in Antioquia, Colombia: the world's highest per capita mercury pollution. *Sci. Total Environ.* 410–411, 154–160.

que en los últimos años la quema indiscriminada de biomasa está a la orden del día.<sup>146</sup> Por todas estas razones, las comunidades ribereñas colombianas están muy expuestas al Hg, ya sea de manera directa por los vapores de la quema de amalgamas o a través de los hábitos alimenticios.<sup>147</sup>

Con el fin de conocer los efectos nocivos del Hg en las comunidades dedicadas a la MAPE en Colombia, pueden determinarse las diferentes especies del metal en varios biomarcadores.<sup>148</sup> Por lo general, suelen preferirse muestras de cabello sobre las muestras de sangre y la orina, debido a la mayor facilidad para su manejo y recolección, lo cual es importante para realizar buenos trabajos de monitorización.<sup>143,146,149</sup> Para evaluar la exposición al MeHg se utiliza habitualmente el análisis de HgT en pelo, ya que el MeHg ingerido mediante el consumo de pescado se excreta por el cabello.<sup>150</sup> No obstante, el Hg (0) gaseoso también puede ser absorbido directamente al cabello durante la exposición a aire contaminado<sup>151</sup> convirtiéndose en Hg(II) fuertemente unido a los constituyentes

---

<sup>146</sup> Crespo-Lopez, M.E., Augusto-Oliveira, M., Lopes-Araújo, A., Santos-Sacramento, L., Yuki Takeda, P., Macchi, B. de M., do Nascimento, J.L.M., Maia, C.S.F., Lima, R.R., Arrifano, G.P., 2021. Mercury: what can we learn from the Amazon? *Environ. Int.* 146, 106223

<sup>147</sup> Barbosa, A.C., Boischio, A.A., East, G.A., Ferrari, I., Gonçalves, A., Silva, P.R.M., da Cruz, T.M.E., 1995. Mercury contamination in the Brazilian Amazon. Environmental and occupational aspects. *Water, Air, Soil Pollut* 80, 109–121.

<sup>148</sup> Poulin, J., Gibb, H., 2008. Mercury: Assessing the Environmental Burden of Disease at National and Local Levels. (WHO Environmental Burden of Disease Series No.16) Editor Prüss-Üstün, Annette. WHO Environmental Burden of Disease, pp. 1–42.

<sup>149</sup> Díez, S., Esbrí, J.M., Tobias, A., Higuera, P., Martínez-Coronado, A., 2011. Determinants of exposure to mercury in hair from inhabitants of the largest mercury mine in the world. *Chemosphere* 84 (5), 571–577.

<sup>150</sup> Salazar-Camacho, C., Salas-Moreno, M., Marrugo-Madrid, S., Marrugo-Negrete, J., Díez, S., 2017. Dietary human exposure to mercury in two artisanal small-scale gold mining communities of northwestern Colombia. *Environ. Int.* 107, 47–54.

<sup>151</sup> Queipo Abad, S., Rodríguez-González, P., García Alonso, J.I., 2016. Evidence of the direct adsorption of mercury in human hair during occupational exposure to mercury vapour. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 36, 16–21.

## Resultados

---

del pelo. Por lo tanto, la determinación de las especies de Hg permite distinguir entre diferentes fuentes de contaminación en individuos expuestos.<sup>152</sup>

Se han desarrollado varios procedimientos para determinar la concentración de las especies de Hg<sup>153,154,155,156,157,158</sup>, pero algunos de estos métodos solo permiten determinar una especie de Hg de cada vez. Un ejemplo es el método de digestión ácida y la posterior etilación en fase acuosa para su análisis por GC-CVAFS.<sup>159,160</sup> En estos casos, es por tanto necesario realizar un segundo análisis para determinar la concentración de HgT, mediante, por ejemplo, la combustión catalítica de la muestra, preconcentración por amalgamación con oro, desorción térmica y AAS.<sup>161</sup>

Cuando se determina simultáneamente más de una especie de Hg, la mayor parte de los métodos no tienen en cuenta las posibles reacciones de alquilación

---

<sup>152</sup> Laffont, L., Maurice, L., Amouroux, D., Navarro, P., Monperrus, M., Sonke, J.E., Behra, P., 2013. Mercury speciation analysis in human hair by species-specific isotope-dilution using GC-ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 3001–3010.

<sup>153</sup> Bermejo-Barrera, P., Verdura-Constenla, E.M., Moreda-Pineiro, A., Bermejo-Barrera, A., 1999. Rapid acid leaching and slurry sampling procedures for the determination of methyl-mercury and total mercury in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 398, 263–272.

<sup>154</sup> Feng, W.Y., Chai, C.F., Qian, Q.F., 1996. A new neutron activation technique for simultaneous determination of inorganic and total mercury contents in human hair. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 212, 61–68.

<sup>155</sup> Kehrig, H.A., Malm, O., Akagi, H., 1997. Methylmercury in hair samples from different riverine groups, Amazon, Brazil. *Water, Air, Soil Pollut* 97, 17–29.

<sup>156</sup> Liang, L., Horvat, M., Bloom, N.S., 1994. An improved speciation method for mercury by GC/CVAFS after aqueous phase ethylation and room temperature precollection. *Talanta* 41, 371–379.

<sup>157</sup> Morton, J., Carolan, V.A., Gardiner, P.H.E., 2002. The speciation of inorganic and methylmercury in human hair by high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 377–381.

<sup>158</sup> Wu, Y., Lee, Y.I., Wu, L., Hou, X., 2012. Simple mercury speciation analysis by CVG-ICPMS following TMAH pre-treatment and microwave-assisted digestion. *Microchem. J.* 103, 105–109.

<sup>159</sup> Montuori, P., Jover, E., Alzaga, R., Díez, S., Bayona, J.M., 2004. Improvements in the methylmercury extraction from human hair by headspace solid-phase microextraction followed by gas-chromatography cold-vapour atomic fluorescence spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1025, 71–75

<sup>160</sup> Montuori, P., Jover, E., Díez, S., Ribas-Fito, N., Sunyer, J., Triassi, M., Bayona, J.M., 2006. Mercury speciation in the hair of pre-school children living near a chlor-alkali plant. *Sci. Total Environ.* 369, 51–58.

<sup>161</sup> Díez, S., Montuori, P., Querol, X., Bayona, J.M., 2007. Total mercury in the hair of children by combustion atomic absorption spectrometry (Comb-AAS). *J. Anal. Toxicol.* 31, 144–149.

y desalquilación que ocurren durante el proceso de preparación de la muestra.<sup>124</sup> Como se ha dejado claro en el primer capítulo de la presente Tesis Doctoral, para corregir las reacciones de interconversión entre las especies y determinar de manera exacta y precisa la concentración de las mismas la mejor de las opciones es la IDMS con trazador múltiple en combinación con GC-ICP-MS.

Por otra parte, y como ya se había comentado en la Introducción General, resulta necesario aportar credibilidad a los resultados analíticos obtenidos, para lo que se hace uso de materiales de referencia. Son varias las instituciones que se encargan de la elaboración de estos materiales y para la obtención de los valores de referencia, además de analizar ellos mismos los materiales,<sup>162,163</sup> también los envían a diversos laboratorios del mundo. Respecto a los materiales disponibles para la especiación de Hg en pelo, los más utilizados son el IAEA-085, IAEA-086 y el NIES CRM N°13, sin embargo, con el paso de los años las existencias se van agotando y es inevitable la elaboración de nuevos materiales.

### D.2.2. Objetivos

En este segundo capítulo se determinaron las concentraciones de MeHg, Hg(II) y HgT por IDMS mediante GC-ICP-MS. Por un lado, se determinaron simultáneamente las concentraciones de MeHg, Hg(II) y HgT mediante IDMS con doble trazador y GC-ICP-MS en muestras de cabello humano de individuos de comunidades que practican la MAPE. Por otro lado, se determinaron las concentraciones de MeHg y Hg(II) mediante IDMS con doble trazador y la concentración de HgT mediante IDMS con un solo trazador y GC-ICP-MS de un

---

<sup>162</sup> Heller-Zeisler, S. F., Parr, R. M., Zeisler, R., 1998. Certification of two human hair reference materials issued by the International Atomic Energy Agency. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 360, 419-422.

<sup>163</sup> Yoshinaga, J., Morita, M., Okamoto, K. 1997. New human hair certified reference material for methylmercury and trace elements. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 357, 279-283.

material de referencia proporcionado por el NIES para su certificación. Estos objetivos generales se dividieron en los siguientes objetivos parciales:

- Determinación de la concentración de las especies de Hg en pelo en relación con el HgT en personas implicadas y no implicadas en las tareas de la MAPE.
- Comparación de las concentraciones de Hg en el cabello con las pautas de consumo de pescado y cotejo con la información bibliográfica de los yacimientos mineros de oro colombianos.
- Validación de la metodología como aproximación para la distinción del MeHg proveniente del consumo de pescado y del Hg(II) absorbido en el pelo por la exposición directa a vapores de la quema de amalgamas.
- Optimización del método para el análisis del HgT del material de referencia de pelo humano proporcionado por el NIES.
- Determinación de la concentración de las especies de Hg y del HgT del material de referencia de pelo humano proporcionado por el NIES.

### D.2.3. Experimental

#### D.2.3.1. Instrumentación

Al igual que los equipos utilizados a lo largo del primer capítulo, los equipos de este segundo capítulo han sido comentados en la sección **C.1.** del Experimental General.

Se usaron los mismos equipos para la preparación de las muestras y del material de referencia que los utilizados en el **Capítulo I** (sección **D.1.3.1.**), además de la placa calefactora Savillex HPX-200 (Savillex, Minnetonka, MN, EE.UU.).

Para la medida de las muestras y del material de referencia se utilizó un ICP-MS Agilent 7900ce, acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent 7890A (Agilent Technologies, Tokio, Japón). Los parámetros experimentales están resumidos en la **Tabla 5** y **Tabla 7** del Experimental General.

#### D.2.3.2. Reactivos y materiales

El material y los reactivos utilizados están recogidos en la sección **C.2.** del Experimental General. En este segundo capítulo, se utilizó el material de referencia certificado de pelo humano (IAEA-086). Para la determinación de las especies de Hg se usaron dos patrones enriquecidos  $\text{Me}^{201}\text{Hg}$  y  $^{199}\text{Hg}(\text{II})$  adquiridos a ISC-Science S.L. (Oviedo, España). Los compuestos se derivatizaron utilizando una disolución al 2% en volumen de tetra-n-etilborato de sodio.

#### D.2.3.3. Procedimientos

Tanto el procedimiento seguido para la preparación de las muestras y del material de referencia, como el procedimiento seguido para la medida de las abundancias isotópicas del MeHg y del Hg(II) han sido detallados en los apartados **C.3.2.**, **C.3.3.** y **C.3.5.** de la sección procedimientos del Experimental General.

Para los análisis estadísticos de las muestras de pelo de individuos de Colombia se utilizó el programa IBS SPSS Statistics. Se aplicaron pruebas no paramétricas, ya que las concentraciones de Hg no seguían una distribución normal. Las diferencias entre grupos se comprobaron mediante Kruskal Wallis. El grado de significación se fijó en  $p < 0,05$  y se usaron la mediana y el rango intercuartílico (IQR, percentil 25 y percentil 75) para explicar los resultados.

Las muestras de cabello se recogieron en individuos de varias zonas mineras de seis diferentes departamentos de Colombia: cinco regiones andinas (Nariño, Chocó, Antioquia, Bolívar y Sucre) y una región amazónica (Vaupés). Los hábitos alimenticios y las estrategias de extracción de oro fueron diferentes en las distintas

regiones. La dieta de la población de la región amazónica del Vaupés y de la región andina del Chocó se basa tradicionalmente en el consumo de pescado, mientras que las poblaciones de las dos regiones andinas de Antioquia y Nariño no son grandes consumidoras de pescado. La MAPE está especialmente presente en Chocó y Antioquia, donde se demanda más Hg, debido a la mineralización de cuarzo del oro, en comparación con la demanda de Hg de los yacimientos de oro aluvial.<sup>164,165</sup>

La estrategia de reclutamiento de los individuos se diseñó para incluir a residentes expuestos a Hg ambiental, en su mayoría no implicados en actividades ocupacionales de extracción de oro. Todos los participantes comprendieron la finalidad del estudio y aceptaron participar firmando un formulario de consentimiento informado, después de explicarles los objetivos y el alcance del estudio. Tras el permiso, se recogieron muestras de pelo de 96 sujetos de la zona occipital con tijeras de acero inoxidable, como se adelantó en el apartado **C.3.1.** de la sección procedimientos del Experimental General. A continuación, las muestras de pelo se guardaron y se identificaron debidamente. También se recogieron datos de todos los participantes relacionados con su peso, altura, edad, sexo, hábitos de consumo de pescado y empleo. El cuestionario incluyó preguntas específicas sobre la frecuencia de consumo de pescado: menos de 1 veces/semana, 1-2 veces/semana, 3-4 veces/semana y 5-7 veces/semana.

Para el cálculo de la humedad del material de referencia proporcionado por el NIES se siguieron las especificaciones aportadas por el organismo. Se tomaron 0,2 gramos de material y se mantuvieron en la estufa a 85°C durante 4 horas.

---

<sup>164</sup> Cremers, L., Kolen, J., Theije, M., 2013. SMALL-SCALE gold mining in the amazon. In: Cuadernos Del CEDLA, pp. 1-16

<sup>165</sup> Gutiérrez-Mosquera, H., Sujitha, S.B., Jonathan, M.P., Sarkar, S.K., Medina-Mosquera, F., Ayala-Mosquera, H., Morales-Mira, G., Arreola-Mendoza, L., 2018. Mercury levels in human population from a mining district in Western Colombia. *J. Environ. Sci. (China)* 68, 83-90.

## D.2.4. Resultados

### D.2.4.1. Control de calidad de las muestras de pelo

El control de calidad de los resultados se realizó analizando, en cada sesión de medida, el material de referencia de cabello humano certificado IAEA-086. Los resultados medios de todas las sesiones de media se muestran en la **Tabla 17**.

**Tabla 17.** Comparación de los valores certificados y experimentales obtenidos en el análisis del material de referencia certificado IAEA-086 (cabello humano) para MeHg, Hg(II) y HgT ( $\text{ng g}^{-1}$ ). La incertidumbre de los valores experimentales corresponde a la desviación estándar obtenida en el análisis de  $n=12$  réplicas independientes.

IAEA-086	MeHg ( $\text{ng Hg g}^{-1}$ )	Hg(II) ( $\text{ng Hg g}^{-1}$ )	HgT ( $\text{ng Hg g}^{-1}$ )
Valor certificado	$258 \pm 23$	-	$573 \pm 39$
Experimental ( $n=12$ )	$271 \pm 5$	$281 \pm 15$	$552 \pm 15$

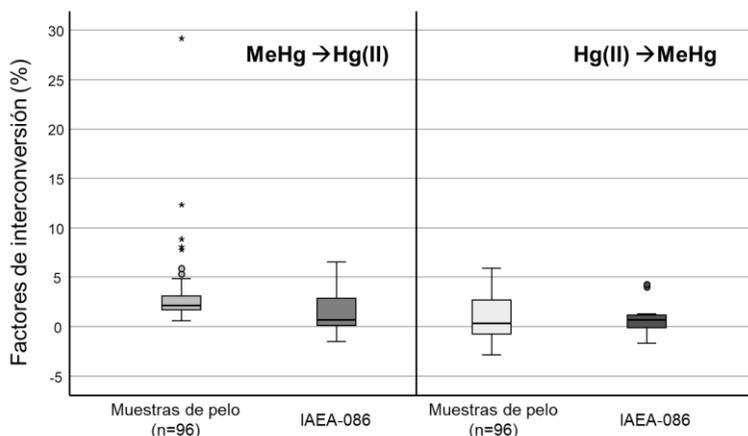
Como puede observarse, los valores experimentales obtenidos para HgT y MeHg concuerdan bien con los valores de referencia. Además, aunque el material IAEA-086 no está certificado para Hg(II), los valores experimentales sí que concuerdan con los valores obtenidos en publicaciones anteriores.<sup>110,152</sup> Los límites de detección y cuantificación calculados a partir de seis blancos de procedimiento se muestran en la **Tabla 18**. Los valores de LD y LC fueron significativamente inferiores a los valores obtenidos en todas las muestras de pelo analizadas en este trabajo.

## Resultados

**Tabla 18.** Blancos, L.D. y L.C. calculados para Hg(II), MeHg y HgT (ng Hg g<sup>-1</sup>) a partir de la determinación de n=6 blancos de procedimiento independientes considerando una cantidad de muestra teórica de 0,1 g.

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	Media	SD	L.D.	L.C.
Hg(II) (ng Hg g <sup>-1</sup> )	3,65	1,84	2,85	2,59	4,02	2,61	2,93	0,79	2,37	3,95
MeHg (ng Hg g <sup>-1</sup> )	1,30	1,69	1,07	2,49	1,30	1,22	1,51	0,52	1,56	2,61
HgT (ng Hg g <sup>-1</sup> )	4,95	3,54	3,92	5,08	5,32	3,83	4,44	0,76	2,28	3,80

Los factores de interconversión determinados para el material de referencia fueron estadísticamente similares a los obtenidos para las muestras, como se muestra en la **Figura 42**. El factor de desmetilación del MeHg (F2) fue el factor más relevante de acuerdo con los resultados obtenidos en el primer capítulo (**D.1.4.5.**) y en estudios previos.<sup>110</sup> Para la mayoría de las muestras reales, F2 (%), fue inferior a 5% (valores IQR entre 1,7% y 3,1%), excepto para una muestra en la que se obtuvo un valor del 29,2%. El factor de metilación del Hg(II) (F1) fue despreciable en la mayoría de las muestras. Estas reacciones de interconversión se tuvieron en cuenta para el cálculo de las concentraciones específicas de las especies de Hg obtenidas IDMS con doble trazador.



**Figura 42.** Factores de metilación F1 (%) y desmetilación F2 (%) obtenidos en el análisis de n=96 muestras de pelo humano y para el material de referencia certificado IAEA-086. Los percentiles 25, 50 y 75 están representados por recuadros y los valores máximo y mínimo por bigotes. Los círculos representan los valores atípicos y los asteriscos los extremos.

#### D.2.4.2. Estudio sociodemográfico

La mayoría de los participantes (N = 96) en el estudio fueron mujeres (77,08%, N = 74). La edad media fue de 36,92 años. Únicamente el 12,50% de los encuestados fueron niños, con edades comprendidas entre los 6 y los 17 años. La mayoría de los encuestados (79%) tenían un nivel educativo bajo, ya que 73 adultos tenían un nivel de estudios inferior a la enseñanza secundaria.

La ingesta de pescado y las tareas relacionadas con la MAPE se consideraron variables importantes. Este estudio se centró en la población general, en su mayoría no implicada en tareas mineras. Sólo el 16,67% de los individuos participaron en algún momento en trabajos de la MAPE o en actividades relacionadas con el Hg. El consumo de pescado se clasificó como se indica en un estudio previo<sup>143</sup> y se describe en la **Tabla 19**.

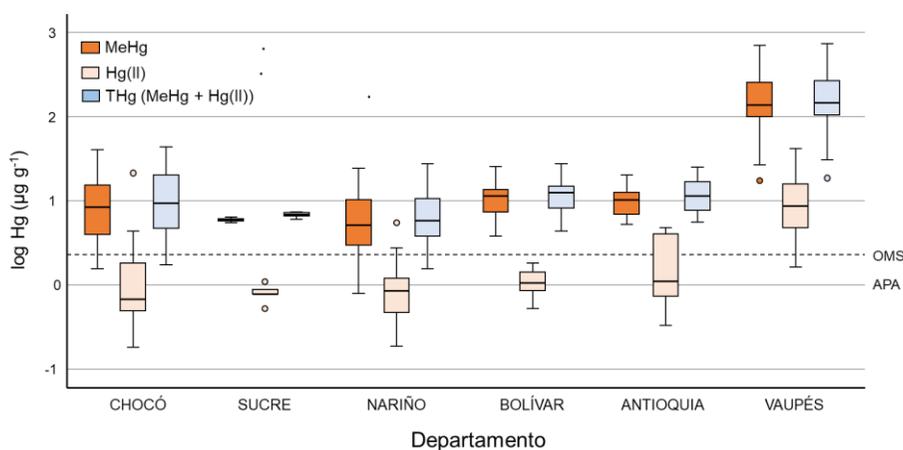
En general, el consumo de pescado osciló de 3 a 7 veces por semana, lo que lo sitúa en niveles de ingesta entre medios y altos.

**Tabla 19.** Variables descriptivas de los individuos colombianos (n = 96) distribuidos por departamentos.

	Todos los departamentos (n=96)	Chocó (n=20)	Sucre (n=5)	Nariño (n=22)	Bolívar (n=6)	Antioquia (n=6)	Vaupés (n=31)
Género, femenino (%)	77,08	75	60	90,91	83,33	100	64,52
Media de edad (años)	36,92	43	22,4	44,05	22,75	32,33	36,65
Consumo de pescado (%)							
< 1 veces/semana	6,25	30	-	-	8,33	-	-
1-2 veces/semana	20,83	15	40	59,09	-	33,33	-
3-4 veces/semana	36,46	35	20	36,36	91,67	66,67	12,9
5-7 veces/semana	36,46	20	40	4,55	8,33	-	87,1
MAPE o tareas relacionadas con Hg (%)	16,67	15	-	50	-	33,33	-

D.2.4.3. Metilmercurio en las muestras de pelo de individuos de Colombia

Las concentraciones de MeHg en las muestras de pelo se recogen en la **Figura 43** y la **Tabla 20**. De acuerdo con los valores de las medianas de MeHg, los departamentos siguieron el orden: Vaupés > Bolívar > Antioquia > Sucre > Chocó > Nariño. Vaupés fue la región con la mediana más alta de contenido de MeHg en pelo ( $13,75 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ , IQR 9,84-26,29). El valor de la mediana de MeHg en Vaupés fue estadísticamente diferente de los otros departamentos ( $p < 0,05$ ) y no se encontraron diferencias estadísticas entre el resto de las regiones colombianas.



**Figura 43.** Concentraciones de MeHg, Hg(II) y HgT (MeHg + Hg(II)) ( $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) obtenidas en las muestras de cabello de los diferentes departamentos colombianos. La línea punteada representa el límite de la OMS<sup>166</sup> de  $2,2 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ , y la línea continua es el límite de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (APA)<sup>167</sup> de  $1,0 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ .

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en función del sexo ( $p < 0,05$ ). Los varones presentaron un valor medio de  $8,8 \mu\text{g Hg g}^{-1}$  (IQR 0,78-16,26) y un valor máximo de  $45,90 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ . Por otro lado, las mujeres presentaron un valor medio de  $1,05 \mu\text{g Hg g}^{-1}$  (IQR 0,54-2,74) y un valor máximo de  $70,36 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ . La mujer con el nivel más alto de MeHg declaró un elevado

<sup>166</sup> JECFA, 2006. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. Sixty-Seventh Meeting of the Joint. FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Rome, Italy.

<sup>167</sup> USEPA, 2005. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water. Water Quality Criterion for the Protection of Human Health Methylmercury.

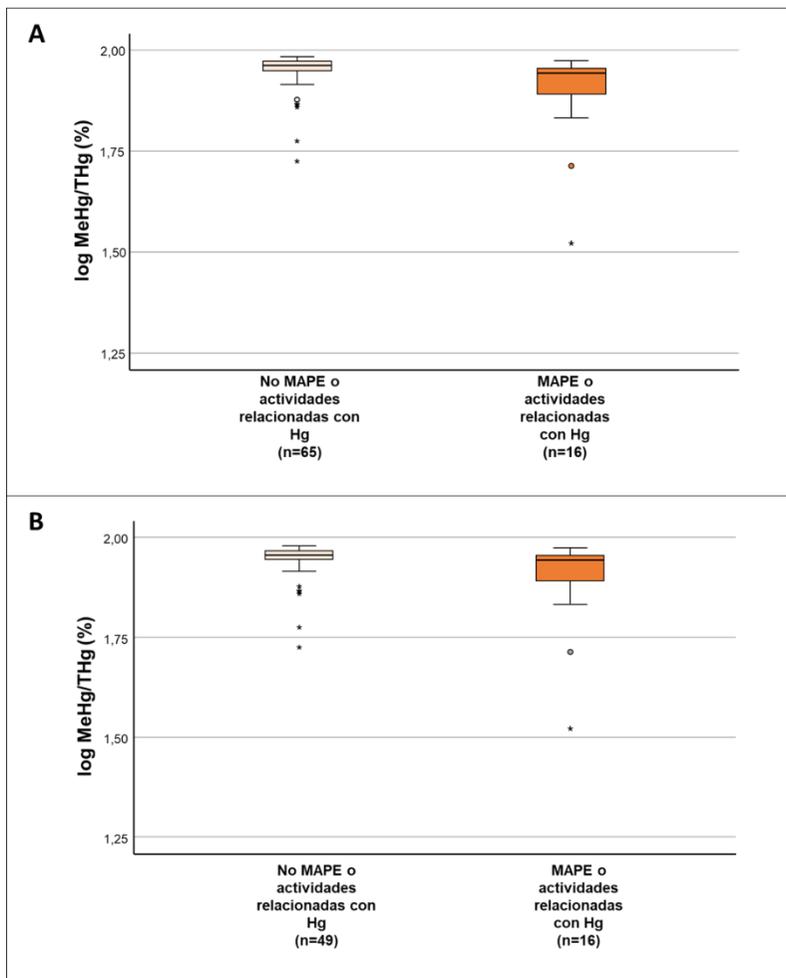
## Resultados

---

consumo de pescado (7 veces/semana) y no participaba en tareas de la MAPE. En concordancia con estudios previos realizados en el Amazonas<sup>146</sup>, la mayoría de las muestras presentaron un % de MeHg relativo a HgT superior al 80% como se muestra en la **Figura 44**. Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) para MeHg/HgT (%) cuando se compara a los trabajadores de la MAPE con personas no involucradas en tareas mineras, incluso si los sujetos de Vaupés son (**Figura 44A**) o no son considerados (**Figura 44B**).

**Tabla 20.** Media, máximo, mínimo, mediana y rango intercuartílico (percentil 25 - 75) de los valores experimentales obtenidos para MeHg, Hg(II) y HgT (MeHg + Hg(II)) ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en las muestras de pelo distribuidas por departamentos.

	Todos los departamentos (n=96)					
	Chocó (n=20)	Sucre (n=5)	Nariño (n=22)	Bolívar (n=12)	Antioquia (n=6)	Vaupés (n=31)
<b>MeHg (<math>\mu\text{g Hg g}^{-1}</math>)</b>						
Media	7,01	0,59	0,7	1,21	1,1	19,72
Mínimo	0,08	0,35	0,08	0,38	0,52	1,72
Máximo	70,36	0,74	2,47	2,58	2,05	70,36
Mediana	1,2	0,59	0,57	1,15	1,04	13,75
IQR	0,59-9,36	0,44-0,73	0,27-1,03	0,72-1,39	0,66-1,47	9,84-26,29
<b>Hg(II) (<math>\mu\text{g Hg g}^{-1}</math>)</b>						
Media	0,49	0,11	0,11	0,11	0,2	1,2
Mínimo	0,02	0,05	0,02	0,05	0,03	0,16
Máximo	4,21	0,24	0,55	0,18	0,48	4,21
Mediana	0,14	0,08	0,09	0,11	0,11	0,86
IQR	0,07-0,54	0,07-0,17	0,05-0,11	0,08-0,14	0,06-0,43	0,44-1,66
<b>HgT (<math>\mu\text{g Hg g}^{-1}</math>) (MeHg + Hg (II))</b>						
Media	7,5	0,69	0,81	1,32	1,31	20,92
Mínimo	0,15	0,39	0,15	0,43	0,56	1,88
Máximo	73,72	0,99	2,74	2,72	2,54	73,72
Mediana	1,44	0,67	0,63	1,27	1,15	14,66
IQR	0,68-9,61	0,50-0,90	0,35-1,10	0,80-1,50	0,72-1,90	10,07-27,80



**Figura 44.** Proporción MeHg/HgT (%) en el pelo de los individuos colombianos en relación con tareas relacionadas con Hg incluyendo Vaupés (A), sin incluir Vaupés (B).

D.2.4.4. Mercurio inorgánico en las muestras de pelo de individuos de Colombia

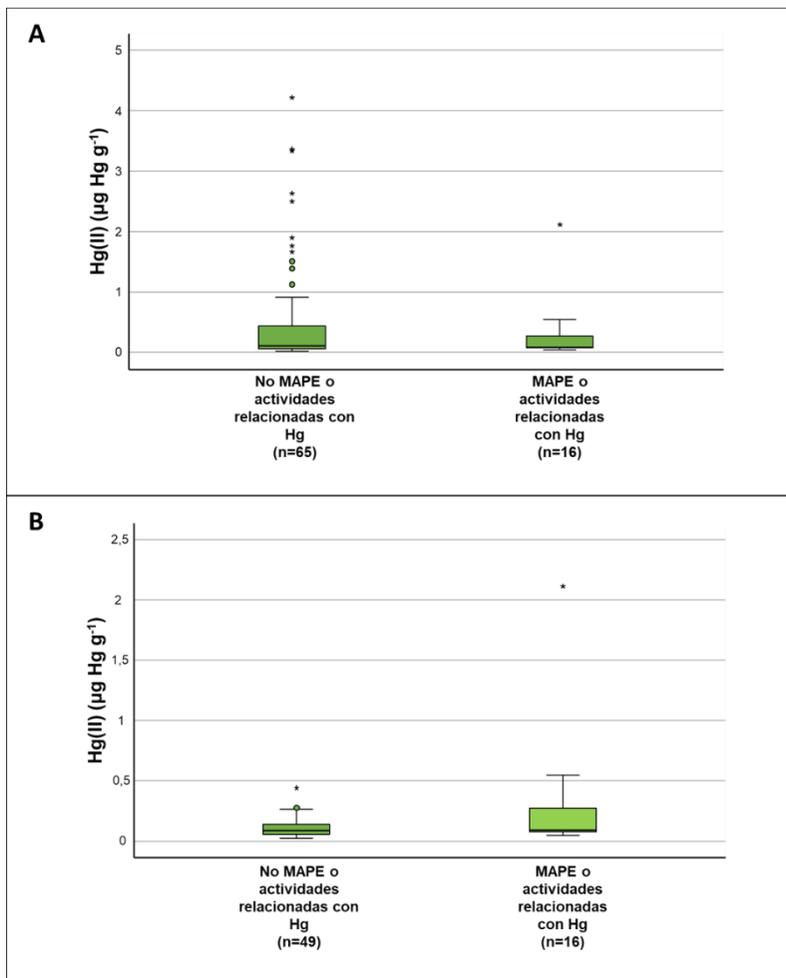
Las concentraciones de Hg(II) en las muestras también se resumen en la **Figura 43** y en la **Tabla 20**. Se obtuvo un valor de la mediana mucho más bajo que el del MeHg ( $0,14 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ ). Vaupés fue también la región con el valor de la mediana más alto de Hg(II) ( $0,86 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ ), siendo de nuevo estadísticamente diferente de los otros departamentos. Antioquia y Bolívar tuvieron el mismo valor de la mediana de  $0,11 \mu\text{g Hg g}^{-1}$  (IQR  $0,06-0,43$  y  $0,05-0,11$ , respectivamente). El orden

de los departamentos, de acuerdo con los valores de mediana para Hg(II) fue Vaupés > Antioquia = Bolívar > Nariño > Sucre > Chocó

De acuerdo con el sexo, las mujeres y los hombres fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ). Se obtuvo un valor para la mediana 4 veces mayor para los varones ( $0,44 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) que para las mujeres ( $0,11 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) (IQR 0,12-0,93 y 0,07-0,41, respectivamente). El valor máximo para los varones fue de  $42,14 \mu\text{g Hg g}^{-1}$  y para las mujeres  $33,62 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ .

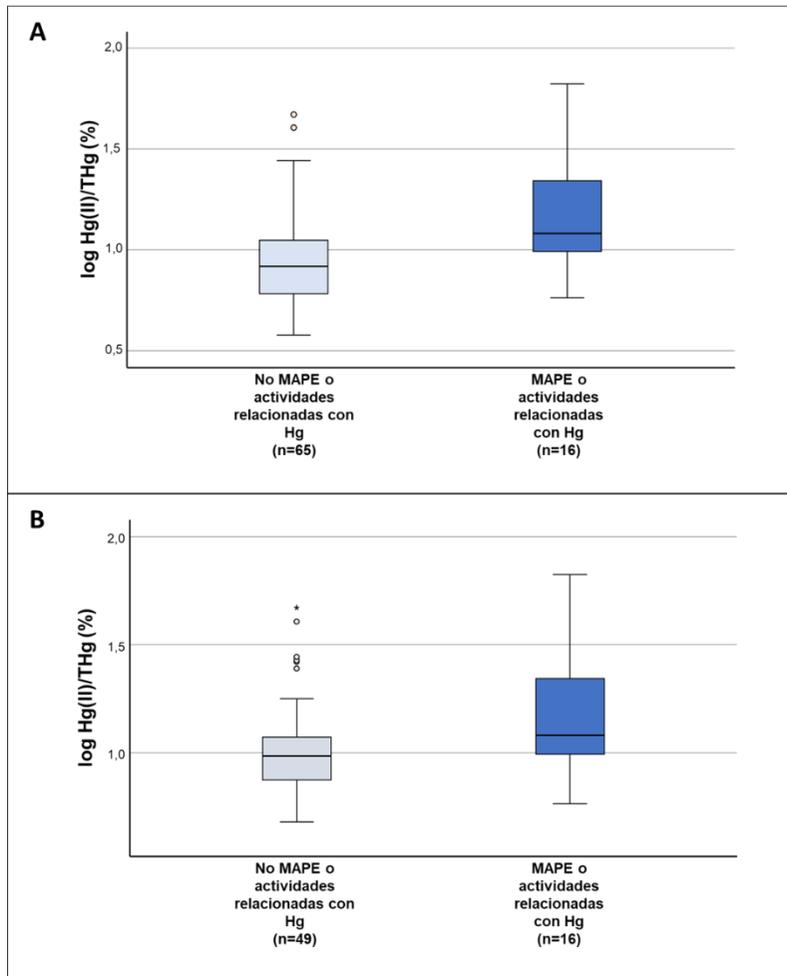
De entre todos los participantes, solo un individuo de Chocó tenía un nivel de concentración de Hg(II) superior al MeHg ( $2,11$  y  $1,05 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ , respectivamente). Este individuo de sexo masculino reportó un nivel de consumo de pescado medio (3-4 veces por semana) y había estado usando Hg en su empleo actual durante 24 meses, pero no amalgamaba ni en casa ni en el trabajo.

El valor medio de Hg(II) en relación con el HgT fue del 11% y solo 10 individuos tuvieron un contenido de Hg(II) superior al 30%. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) cuando se comparó la cantidad de Hg(II) entre las personas implicadas en tareas relacionadas con la MAPE y las no relacionadas (**Figura 45**).



**Figura 45.** Concentración de Hg(II) ( $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) en el pelo de los individuos colombianos en relación con las tareas que involucran Hg. Considerando Vaupés (A), y no considerando Vaupés (B).

Curiosamente, se encontraron diferencias significativas entre los grupos evaluados ( $p < 0,05$ ) cuando se comparó el porcentaje de Hg(II)/HgT de los grupos (**Figura 46**). De hecho, las personas implicadas en tareas de la MAPE mostraron 1,7 veces más Hg(II)/HgT (%) frente a las personas no implicadas, cuando se incluyeron los individuos de Vaupés ( $p = 0,020$ ) (**Figura 46A**) y cuando no ( $p = 0,025$ ) (**Figura 46B**).



**Figura 46.** Proporción Hg(II)/HgT (%) en el pelo de los individuos colombianos en relación con tareas relacionadas con Hg incluyendo Vaupés (A), sin incluir Vaupés (B).

D.2.4.5. Mercurio total en las muestras de pelo de individuos de Colombia

Las dosis de referencia de ingesta semanal aceptable de MeHg establecidas por la APA<sup>167</sup> y la OMS<sup>166</sup> son equivalentes a 1 µg Hg g<sup>-1</sup> y 2,2 µg Hg g<sup>-1</sup> de HgT en el pelo, respectivamente.

En este estudio, las concentraciones de HgT se obtuvieron a partir de la suma de MeHg y Hg(II) mediante ID-GC-ICP-MS. Los resultados de HgT se encuentran resumidos en la **Figura 43** y la **Tabla 20**. La mediana de los valores de HgT estaba

por debajo del valor de la dosis de referencia de la OMS para todos los departamentos, exceptuando Vaupés, con niveles 7 veces superiores ( $14,66 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ , IQR 10,07-27,80). Esto concuerda con informes anteriores<sup>143</sup>, que también obtuvieron los mayores valores de concentración de HgT para la región del Vaupés, en comparación con los demás departamentos de Colombia. Teniendo en cuenta el valor de la APA, la mediana de la concentración de HgT obtenida en todos los departamentos es superior a la ingesta semanal aceptable de MeHg. De acuerdo con los valores de las medianas de HgT, los departamentos siguieron el mismo orden que para el MeHg, con excepción de la región de Chocó, con un valor de mediana superior al de Sucre.

#### D.2.4.6. Metilmercurio en el material de referencia proporcionado por el NIES

Se analizaron tres alícuotas independientes de las dos botellas de material proporcionadas por el NIES (Botella A y Botella B). Las muestras se midieron en dos sesiones de medida en días consecutivos, para evitar la degradación del material. Además, a modo de control de calidad se analizó por triplicado el material de referencia IAEA-086. También se analizó un blanco de procedimiento y un blanco del equipo. El blanco de procedimiento se preparó igual que el material, mientras que para el blanco del equipo se derivatizó una menor cantidad de ambos trazadores.

Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 21**, tal y como han sido solicitados por el NIES. Los valores obtenidos para las tres alícuotas independientes de las dos botellas son similares entre sí. Se obtuvieron resultados similares también para el segundo día de medida. Como era de esperar se obtuvo un blanco instrumental más bajo que el blanco de procedimiento.

**Tabla 21.** Valores de MeHg obtenidos en dos sesiones de medida para tres alícuotas independientes de dos botellas del material de referencia proporcionado por el NIES, tres alícuotas del material IAEA-086, un blanco instrumental y un blanco de procedimiento (mg Kg<sup>-1</sup>).

Día	Nombre de la muestra	Concentración MeHg (mg kg <sup>-1</sup> )
1	Blanco instrumental	0,0005
1	Blanco de procedimiento	0,0011
1	Muestra similar (IAEA-086) 1	0,29
1	Muestra similar (IAEA-086) 2	0,27
1	Muestra similar (IAEA-086) 3	0,28
1	Botella de pelo A 1	0,86
1	Botella de pelo A 2	0,88
1	Botella de pelo A 3	0,87
1	Botella de pelo B 1	0,86
1	Botella de pelo B 2	0,87
1	Botella de pelo B 3	0,87
2	Blanco instrumental	0,0004
2	Blanco de procedimiento	0,0076
2	Muestra similar (IAEA-086) 1	0,28
2	Muestra similar (IAEA-086) 2	0,28
2	Muestra similar (IAEA-086) 3	0,27
2	Botella de pelo A 1	0,85
2	Botella de pelo A 2	0,86
2	Botella de pelo A 3	0,87
2	Botella de pelo B 1	0,88
2	Botella de pelo B 2	0,89
2	Botella de pelo B 3	0,89

## Resultados

### D.2.4.7. Mercurio total en el material de referencia proporcionado por el NIES

Para la determinación de la concentración de HgT primero se pusieron a punto las condiciones de extracción del HgT en pelo. Se aplicaron diferentes condiciones al material de referencia IAEA-086, las cuales se encuentran recogidas en la **Tabla 22**.

**Tabla 22.** Diferentes condiciones de extracción del HgT para el material de referencia de pelo humano IAEA-086.

Masa IAEA-086 (g)	Medio oxidante (ml)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	THg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	2SD
	<b>Valor certificado</b>			<b>0,573</b>	<b>0,078</b>
0,2	3 ml HNO <sub>3</sub>	110	4	0,550	0,067
0,2	3 ml HNO <sub>3</sub> + 0,75 ml H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	110	4	0,508	0,086
0,1	0,75 ml HNO <sub>3</sub>	80	1	0,422	0,055
0,1	0,75 ml HNO <sub>3</sub>	80	4	0,525	0,007

Se eligieron como condiciones óptimas las primeras (3 mL HNO<sub>3</sub> *sub-boiling*, 110°C durante 4 horas) debido a que proporcionaron los mejores resultados, como se observa en la **Tabla 22**, permitiendo la completa oxidación de las especies de Hg a Hg(II) y se aplicaron a tres alícuotas independientes de las dos botellas proporcionadas por el NIES. Al igual que para la determinación de MeHg, se analizó por triplicado el material de referencia IAEA-086, además de un blanco de procedimiento y de un blanco del equipo.

En la **Tabla 23** se recogen los resultados obtenidos en dos sesiones de medida independientes. Al igual que para el caso de concentración de MeHg, los resultados, tanto para las tres alícuotas independientes, como para ambas botellas, son muy similares entre sí. También los resultados de ambas sesiones coinciden.

**Tabla 23.** Valores de HgT obtenidos en dos sesiones de medida para tres alícuotas independientes de dos botellas del material de referencia proporcionado por el NIES, tres alícuotas del material IAEA-086, un blanco instrumental y un blanco de procedimiento (mg Kg<sup>-1</sup>).

Día	Nombre de la muestra	Concentración HgT (mg kg <sup>-1</sup> )
1	Blanco instrumental	0,0090
1	Blanco de procedimiento	0,0117
1	Muestra similar (IAEA-086) 1	0,56
1	Muestra similar (IAEA-086) 2	0,54
1	Muestra similar (IAEA-086) 3	0,53
1	Botella de pelo A 1	1,05
1	Botella de pelo A 2	1,06
1	Botella de pelo A 3	1,04
1	Botella de pelo B 1	1,03
1	Botella de pelo B 2	1,09
1	Botella de pelo B 3	1,09
2	Blanco instrumental	0,0069
2	Blanco de procedimiento	0,0144
2	Muestra similar (IAEA-086) 1	0,57
2	Muestra similar (IAEA-086) 2	0,53
2	Muestra similar (IAEA-086) 3	0,53
2	Botella de pelo A 1	1,03
2	Botella de pelo A 2	1,02
2	Botella de pelo A 2	1,04
2	Botella de pelo B 1	1,08
2	Botella de pelo B 2	1,08
2	Botella de pelo B 3	1,07

## Resultados

---

### D.2.4.8. Humedad en el material de referencia proporcionado por el NIES

La humedad del material de referencia se obtuvo siguiendo las indicaciones del NIES. Se pesaron tres alícuotas independientes de cada una de las botellas de 0,2 gramos y se mantuvieron en la estufa a 85°C durante 4 horas. Después se volvieron a pesar y con la diferencia entre ambas pesadas se calculó el contenido húmedo, que se encuentra resumido en la **Tabla 24**.

**Tabla 24.** Contenido húmedo del material proporcionado por el NIES calculado para tres alícuotas de cada una de las botellas en dos días.

Día	Nombre de la muestra	Contenido húmedo
1	Botella de pelo A 1	8,88
1	Botella de pelo A 2	9,26
1	Botella de pelo A 3	8,90
1	Botella de pelo B 1	7,50
1	Botella de pelo B 2	7,26
1	Botella de pelo B 3	7,40
2	Botella de pelo A 1	7,99
2	Botella de pelo A 2	7,18
2	Botella de pelo A 3	7,29
2	Botella de pelo B 1	5,95
2	Botella de pelo B 2	5,32
2	Botella de pelo B 3	4,69

Los resultados para tres alícuotas de una misma botella son generalmente similares, aunque varían algo entre botellas. El contenido húmedo entre días también es algo distinto, siendo menor para el segundo de los días que para el primero.

## D.2.5. Discusión de los resultados de las muestras de pelo de Colombia

### D.2.5.1. Consumo de pescado contaminado

En este capítulo se utilizó el pelo como biomarcador para estudiar la exposición humana a especies de mercurio en diferentes regiones colombianas. El contenido de MeHg en el cabello suele asociarse con los hábitos alimenticios. Por ello, se estudió la relación entre la concentración de MeHg en el pelo y el consumo de pescado por semana. La

**Tabla 19** muestra que Vaupés es la región en la que más del 85% de los individuos declararon un alto nivel de consumo de pescado (5-7 veces por semana). Esto podría explicar los altos niveles de MeHg en las muestras de pelo de Vaupés (de hasta  $70,36 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ ). Además, Vaupés forma parte de la región amazónica, donde el aumento de la deforestación y la quema de biomasa conducen a un aumento de los niveles de Hg, por lo que también se espera un mayor contenido de MeHg en los peces de la zona del Amazonas que en los de las regiones andinas.<sup>146</sup>

La **Figura 47** muestra que no hubo diferencias entre los individuos con una frecuencia de consumo de pescado inferior a 1, 1-2 y 3-4 veces por semana. Sin embargo, la mediana de los individuos que consumían con mayor frecuencia pescado (5-7 veces por semana) resultó ser significativamente ( $p < 0,05$ ) superior ( $12,5 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) que la del resto de grupos consumidores. Estos resultados concuerdan con estudios<sup>168,169</sup>, que indican que el consumo de pescado es un

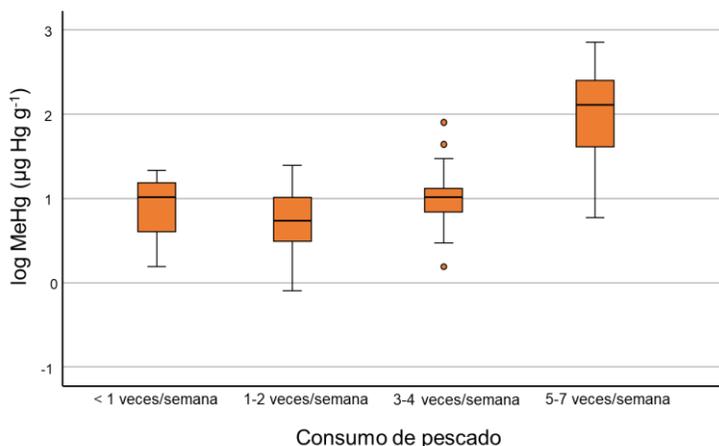
---

<sup>168</sup> Xie, Q., Wang, Y., Li, S., Zhang, C., Tian, X., Cheng, N., Zhang, Y., Wang, D., 2021. Total mercury and methylmercury in human hair and food: implications for the exposure and health risk to residents in the Three Gorges Reservoir Region, China. *Environ. Pollut.* 282, 117041

<sup>169</sup> Shao, D.D., Kang, Y., Cheng, Z., Wang, H.S., Huang, M.J., Wu, S.C., Chen, K.C., Wong, M. H., 2013. Hair mercury levels and food consumption in residents from the Pearl River Delta: south China. *Food Chem.* 136, 682–688.

## Resultados

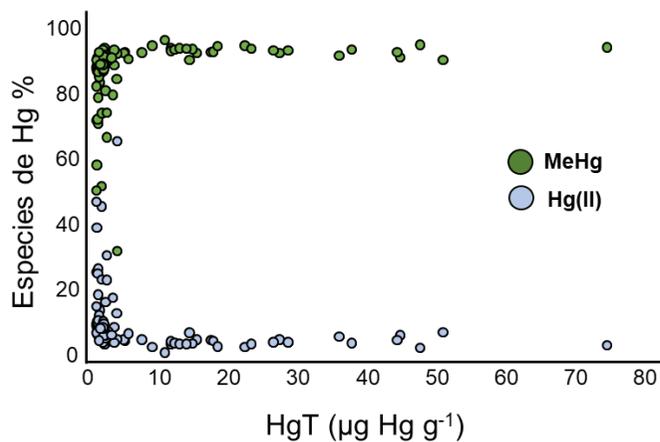
factor importante para la acumulación de MeHg en el pelo. Esto podría también explicarse debido al origen de la mayoría de los individuos de este grupo (Vaupés), al igual que en resultados previos reportados<sup>143</sup>, que encontraron la segunda concentración más alta de MeHg en el cabello en Vaupés, en comparación con otros siete departamentos colombianos (Antioquia, Bolívar, Cauca, Córdoba, Caldas, Guainía y Putumayo).



**Figura 47.** Concentración de MeHg ( $\log \text{MeHg}$ ,  $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) en el pelo de las muestras colombianas para cada grupo de consumo de pescado (veces/semana).

Los datos de este estudio mostraron que la mayoría de las muestras que presentan un %MeHg relativo a HgT superior al 95% están asociadas a concentraciones elevadas de HgT (**Figura 48**). Esto indicaría un alto nivel de consumo de pescado contaminado por parte de estos individuos. Los resultados muestran que cuando concentración de MeHg es alta, la concentración de Hg(II) también es alta, a pesar del hecho de que su contenido porcentual sea inferior al 5%. La mayoría de los individuos con el menor % de Hg(II) son originarios de Vaupés, dado que no están implicados en tareas de la MAPE. Este Hg(II) podría proceder de una vía de desmetilación en el organismo y se incorporaría al pelo, distinguiéndose del Hg(II) depositado/adsorbido directamente de los vapores de

Hg<sup>170</sup>. Para demostrar esto, serían necesarios más estudios sobre fraccionamiento isotópico de las especies de mercurio en el pelo.



**Figura 48.** Porcentaje de especies de Hg en relación con el HgT ( $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ ). Los puntos verdes representan el % de MeHg y los puntos azules el % de Hg(II).

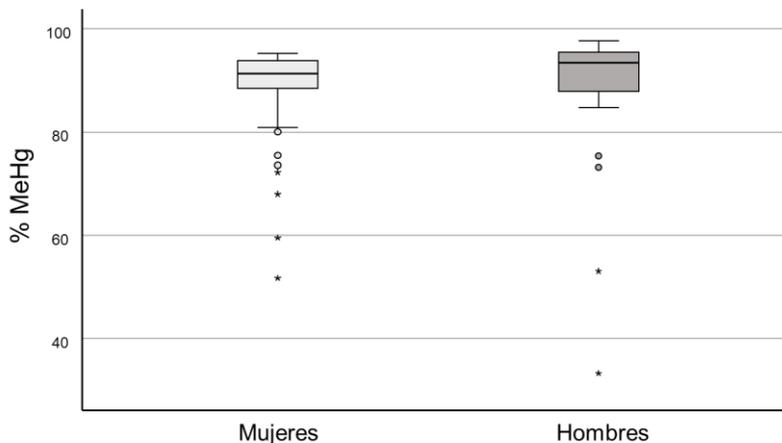
La **Figura 49** muestra que no se encontraron diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ) entre hombres y mujeres al comparar el %MeHg en relación con el HgT, a pesar de que las concentraciones de MeHg son mayores en los hombres. Esto podría explicarse debido al hecho de que los varones ingieren una mayor cantidad de pescado en el mismo número de comidas que las mujeres.<sup>171</sup>

<sup>170</sup>Koenigsmark, F., Weinhouse, C., Berky, A.J., Morales, A.M., Ortiz, E.J., Pierce, E.M., Pan, W.K., Hsu-Kim, H., 2021. Efficacy of hair total mercury content as a biomarker of methylmercury exposure to communities in the area of artisanal and small-scale gold mining in madre de dios, Peru. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 18, 13350.

<sup>171</sup>Díez, S., Montuori, P., Pagano, A., Sarnacchiaro, P., Bayona, J.M., Triassi, M., 2008. Hair mercury levels in an urban population from southern Italy: fish consumption as a determinant of exposure. *Environ. Int.* 34, 162–167.

## Resultados

---



**Figura 49.** Porcentaje de MeHg en relación con el HgT clasificado por género.

### D.2.5.2. Exposición a vapores de Hg

La exposición directa a los vapores de mercurio provoca la adsorción de Hg(II) en el pelo. De los 96 individuos analizados en este trabajo, sólo 16, en su mayoría procedentes de la región de Nariño, declararon estar expuestos directamente a vapores de Hg a través de la combustión de amalgama en el trabajo o en el hogar.

En la **Figura 45** se comparan las concentraciones de Hg(II) en el pelo de los individuos en relación con las tareas que implican Hg, incluyendo (**Figura 45A**) y excluyendo el departamento de Vaupés (**Figura 45B**) debido a las diferencias estadísticas con los valores de los otros departamentos. No se encontraron diferencias entre los dos grupos. No obstante, los valores medios de las personas no implicadas en actividades relacionadas con el Hg son ligeramente inferiores a los valores medios del otro grupo ( $0,08 \mu\text{g Hg g}^{-1}$  y  $0,09 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ , respectivamente). Es probable que, aunque la mayoría de los individuos del estudio no hayan estado expuestos voluntariamente a los vapores de la combustión de mercurio, sí que podrían haber estado expuestos indirectamente debido a la ubicación de sus viviendas cerca de los lugares donde se queman las amalgamas, como los centros de procesamiento (entables), o incluso en los patios traseros de casas de las comunidades.

D.2.5.3. Comparación con otros estudios colombianos

La mayoría de los estudios de Hg en muestras de pelo realizados en población colombiana se han centrado en el HgT y solo unos pocos presentan valores de MeHg. En dichos estudios, los valores de Hg(II) se calcularon a partir de la diferencia de HgT y el MeHg. Las **Tabla 25** y **Tabla 26** muestran un resumen de los trabajos previos reportando MeHg y HgT en cabello de individuos de diferentes regiones colombianas, principalmente mineras. Los valores reportados por estudios previos para la región del Chocó son un poco heterogéneos<sup>150,165,172</sup>. El valor medio obtenido en este estudio se encuentra entre el valor obtenido en 2018 por Palacios-Torres *et al.*<sup>172</sup> para la región de Paimado y el valor medio obtenido en 2017 por Salazar-Camacho *et al.*<sup>150</sup>. El valor medio de MeHg reportado por Salazar-Camacho *et al.*<sup>150</sup> es de aproximadamente  $1 \mu\text{g Hg g}^{-1}$  por encima del valor reportado en este estudio.

Los valores obtenidos en Córdoba<sup>143,173,174,175</sup> podrían ser comparados con los obtenidos en Antioquia, Sucre<sup>177,183</sup> (Argumedo *et al.*, 2013; Olivero-Verbel *et al.*, 2016) y Bolívar<sup>176,179,180</sup>, ya que estas cuatro regiones son adyacentes y algunos de sus territorios forman la región de la Mojana<sup>177,182</sup> (**Figura 50**). Los valores medios y medianos de HgT de estos departamentos son inferiores a  $5 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ , exceptuando los valores de un estudio centrado en una población cercana a una presa hidroeléctrica tropical<sup>174</sup>. En la región de Bolívar se han venido registrando valores medios de HgT desde 1995, los cuales están por encima de los valores medios obtenidos en este estudio. El resto de los valores de la **Tabla 25** y **Tabla 26** para la región Bolívar están también por encima de los valores señalados en este capítulo, excepto el presentado por Calao-Ramos *et al.*<sup>143</sup>, quienes también determinaron valores de MeHg. De hecho, el valor medio de MeHg obtenido en este trabajo es similar al obtenido Calao-Ramos *et al.*<sup>143</sup>. Los valores de MeHg obtenidos para Sucre son similares a los valores reportados en 2001 para los hombres analizados en un estudio centrado en consumidores de arroz

## Resultados

---

contaminado<sup>177</sup>. Los valores de MeHg para Antioquia también son muy similares a los obtenidos por Calao-Ramos *et al.*<sup>143</sup>



**Figura 50.** Mapa de las regiones colombianas estudiadas: cinco departamentos andinos (Nariño, Chocó, Antioquia, Bolívar y Sucre) y uno amazónico (Vaupés).

No hemos encontrado ningún estudio previo que reporte valores de MeHg o HgT en poblaciones de la región de Nariño. Sin embargo, hay algunos estudios previos de los departamentos de Cauca y Putumayo, que son adyacentes a Nariño.<sup>143</sup> Los valores reportados en Cauca<sup>143</sup> para MeHg y HgT son similares a los obtenidos aquí.

Los valores medios de HgT de la región de Vaupés obtenidos en este estudio son muy similares a los valores medios obtenidos en otros departamentos amazónicos<sup>183</sup> y muy inferiores a los valores obtenidos en el Parque Nacional Natural Yaigojé Apaporis, en la Amazonia colombiana<sup>184</sup>. Destaca la diferencia en concentración de los valores de las regiones amazónicas con las demás regiones colombianas. La mediana de MeHg para la región del Vaupés es 3,5 veces menor que el valor obtenido en este estudio.<sup>143</sup>

**Tabla 25.** Resumen de la concentración de HgT y MeHg ( $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) obtenidas en varios estudios de diferentes regiones colombianas. <sup>a</sup>Media  $\pm$  DE; <sup>b</sup>Mediana (rango) (continúa).

Departamento	HgT ( $\mu\text{g/g}$ )	MeHg ( $\mu\text{g/g}$ )	Observaciones
Chocó	2,48 $\pm$ 3,69 <sup>a</sup> (n=81)	2,70 $\pm$ 3,64 <sup>a</sup> (n=81)	Área minera <sup>150</sup>
Chocó	Hombres 15,98 <sup>b</sup> (n=63) Mujeres 8,55 <sup>b</sup> (n=63) Quibdo 6,72 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup> (n=248)	-	Área minera <sup>165</sup>
Chocó	Paimado 0,87 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup> (n=112) Cuenca del río Atrato 4,90 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup> (n=360)	-	Área minera <sup>172</sup>
Córdoba	2,18 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup> (n=112)	-	Área minera <sup>173</sup>
Córdoba	6,95 $\pm$ 5,57 <sup>a</sup> (n=76)	-	Población de cerca de una presa hidroeléctrica <sup>174</sup>
Córdoba	2,46 $\pm$ 1,77 <sup>a</sup> (n=175)	-	Consumo de pescado <sup>175</sup>
Córdoba	2,57 <sup>b</sup> (n=20)	1,30 <sup>b</sup> (n=20)	Mineros <sup>143</sup>
Antioquia	4,37 <sup>b</sup> (n=28)	1,18 <sup>b</sup> (n=28)	Mineros <sup>143</sup>
Sucre	4,91 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup> (n=94)	-	Área minera <sup>176</sup>
Sucre	Hombres 0,65 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup> Mujeres 0,32 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup> (n=20)	Hombres 0,52 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup> Mujeres 0,27 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup> (n=20)	Arroz contaminado <sup>177</sup>
Bolívar	2,84 $\pm$ 3,37 <sup>a</sup> (n=219)	-	Pescadores, mineros y otros <sup>178</sup>

<sup>172</sup> Palacios-Torres, Y., Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J., 2018. Mercury pollution by gold mining in a global biodiversity hotspot, the Choco biogeographic region, Colombia. *Chemosphere* 193, 421–430.

<sup>173</sup> Gracia, L., Marrugo, J.L., Alvis, E., 2010. Contaminación por mercurio en humanos y peces en el municipio de Ayapel, Córdoba, Colombia, 2009. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública* 28, 118–124.

<sup>174</sup> Marrugo-Negrete, J.L., Ruiz-Guzman, J.A., Díez, S., 2013. Relationship between mercury levels in hair and fish consumption in a population living near a hydroelectric tropical dam. *Biol. Trace Elem. Res.* 151, 187–194.

<sup>175</sup> Gracia, L., Chams, L., Hoyos, W., Marrugo, J.L., 2016. Relación de consumo de pescado y niveles de mercurio en pobladores aledanos al río San Jorge, Colombia. *Agron. Colomb.* 34, S1169–S1171.

<sup>176</sup> Olivero, J., Mendonza, C., Mestre, J., 1995. Hair mercury levels in different occupational groups in a gold mining zone in the north of Colombia. *Rev. Saude Publica* 29, 376–379.

<sup>177</sup> Argumedo, M., Consuegra, A., Marrugo, J., Vidal, J., 2013. Exposición a mercurio en habitantes del municipio de San Marcos (Departamento de Sucre) debida a la ingesta de arroz (*Oryza sativa*) contaminado. *Rev. salud pública* 15, 903–915.

<sup>178</sup> Olivero, J., Mendonza, C., Mestre, J., 1995. Hair mercury levels in different occupational groups in a gold mining zone in the north of Colombia. *Rev. Saude Publica* 29, 376–379.

## Resultados

**Tabla 26.** Resumen de la concentración de HgT y MeHg ( $\mu\text{g Hg g}^{-1}$ ) obtenidas en varios estudios de diferentes regiones colombianas. <sup>a</sup>Media  $\pm$  DE; <sup>b</sup>Mediana (rango).

Departamento	HgT ( $\mu\text{g/g}$ )	MeHg ( $\mu\text{g/g}$ )	Observaciones
Bolívar	1,56 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup> (n=1328)	-	Área minera <sup>179</sup>
Bolívar	3,07 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup> 2,02 <sup>b</sup> (n=522)	-	Área minera <sup>180</sup>
Bolívar	1,43 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup> 1,23 <sup>b</sup> (n=194)	-	Adolescentes <sup>181</sup>
Bolívar	0,90 <sup>b</sup> (n=27)	1,05 <sup>b</sup> (n=27)	Mineros <sup>143</sup>
Mojana (Sucre, Bolívar, Córdoba, Antioquia)	2,3 <sup>b</sup> (n=269)	-	Mujeres embarazadas y niñas <sup>182</sup>
Cauca	0,81 <sup>b</sup> (n=45)	0,47 <sup>b</sup> (n=45)	Mineros <sup>143</sup>
Putumayo	1,36 <sup>b</sup> (n=32)	2,01 <sup>b</sup> (n=32)	Mineros <sup>143</sup>
Vaupés	6,06 <sup>b</sup> (n=27)	3,87 <sup>b</sup> (n=27)	Mineros <sup>143</sup>
Amazonas	17,3 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup> (n=200)	-	Área minera <sup>183</sup>
Amazonas	23,0 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup> (n=110)	-	Área minera <sup>184</sup>

<sup>179</sup> Olivero-Verbel, J., Caballero-Gallardo, K., Negrete-Marrugo, J., 2011. Relationship between localization of gold mining areas and hair mercury levels in people from Bolivar, north of Colombia. *Biol. Trace Elem. Res.* 144, 118–132.

<sup>180</sup> Carranza-Lopez, L., Caballero-Gallardo, K., Cervantes-Ceballos, L., Turizo-Tapia, A., Olivero-Verbel, J., 2019. Multicompartment mercury contamination in major gold mining districts at the department of bolivar, Colombia. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 76, 640–649.

<sup>181</sup> Manjarres-Suarez, A., Olivero-Verbel, J., 2020. Hematological parameters and hair mercury levels in adolescents from the Colombian Caribbean. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 14216–14227.

<sup>182</sup> Diaz, S.M., Palma, R.M., Munoz, ~ M.N., Becerra-Arias, C., Nino, ~ J.A.F., 2020. Factors associated with high mercury levels in women and girls from the Mojana region, Colombia, 2013-2015. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 17.

<sup>183</sup> Olivero-Verbel, J., Carranza-Lopez, L., Caballero-Gallardo, K., Ripoll-Arboleda, A., Munoz-Sosa, ~ D., 2016. Human exposure and risk assessment associated with mercury pollution in the Caqueta River, Colombian Amazon. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 20761–20771.

<sup>184</sup> Valdelamar-Villegas, J., Olivero-Verbel, J., 2020. High mercury levels in the indigenous population of the Yaigojé Apaporis national natural Park, Colombian Amazon. *Biol. Trace Elem. Res.* 194, 3–12.

Los otros estudios<sup>143,150</sup> que también determinaron valores de MeHg encontraron una correlación con los valores de HgT y confirman los hábitos alimenticios como la principal fuente de exposición. No se pudo encontrar ningún estudio que discutiera el origen del Hg(II) en el pelo, pero dos posibles fuentes podrían explicar la presencia de Hg(II) en el cabello: la desmetilación del MeHg incorporado a través de la dieta o la adsorción directa de mercurio gaseoso de la atmósfera. Estudios de fraccionamiento isotópico del mercurio podrían aportar información sobre esta cuestión y deberían llevarse a cabo en muestras reales de cabello.

### D.2.6. Conclusiones

En este segundo capítulo se analizaron, por un lado, los niveles de MeHg y Hg(II) en muestras de cabello de Colombia y, por otro, el MeHg y el HgT de un material de referencia proporcionado por el NIES.

Respecto a las muestras de cabello de Colombia se determinó MeHg y Hg(II) en 96 muestras de individuos de seis regiones diferentes de Colombia. Las muestras se analizaron mediante ID-GC-ICP-MS, lo que permitió determinaciones precisas gracias a la corrección de la interconversión de especies durante la preparación de las muestras.

De acuerdo con trabajos previos<sup>143,183,184</sup>, se obtuvieron los valores de concentración más altos para las especies de mercurio en el departamento amazónico de Vaupés, donde se consumen grandes cantidades de pescado contaminado. Los valores de MeHg y Hg(II) obtenidos en los demás departamentos fueron significativamente más bajos que los obtenidos en Vaupés y no se encontraron diferencias estadísticas entre ellos.

Los hombres presentaron concentraciones más altas de las especies de mercurio que las mujeres, pero la misma proporción en relación al HgT. Esto se debe probablemente a la mayor cantidad de pescado consumido por los

## Resultados

---

hombres, en comparación con las mujeres, en el mismo número de comidas. Como era de esperar, las personas que reportaron una mayor frecuencia de consumo de pescado (5-7 veces por semana) tuvieron valores significativamente más altos que los de los otros grupos de consumidores.

El nivel de la mediana de Hg(II) de las personas involucradas en tareas relacionadas con la MAPE fue más alto, aunque no significativamente diferente ( $p > 0,05$ ), al del resto de las personas que participaron en este estudio. Si se encontraron diferencias significativas entre las personas involucradas y no involucradas en las tareas de la MAPE cuando se estudió el porcentaje de la proporción Hg(II)/HgT de estos grupos (1,7 veces).

Los resultados de este estudio contribuyen a ampliar la información sobre las poblaciones colombianas afectadas por la MAPE y sugieren que la determinación de Hg(II) mediante IDMS-GC-ICP-MS podría ser un buen indicador para descubrir la adsorción de Hg(II) por exposición directa a vapores de mercurio en el cabello, si se puede descartar alguna vía de desmetilación mediante experimentos adicionales que utilicen técnicas isotópicas.

El material de referencia proporcionado por el NIES también se analizó mediante ID-GC-ICP-MS. Se determinó el MeHg por medio de IDMS con múltiple trazador para la corrección de la interconversión de las especies y el HgT mediante IDMS con un solo trazador, ya que el MeHg se oxidó previamente a Hg(II). Se obtuvieron valores de concentración similares para las tres replicas independientes de las dos botellas analizadas, tanto para MeHg como para HgT. Los valores del segundo día de medida también fueron muy similares a los del primero en ambos casos. El contenido húmedo varió algo entre botellas y entre días, pero fue similar para las réplicas de una misma botella.





### **D.3. CAPÍTULO III**

**Comparación de diferentes procedimientos de corrección del fenómeno de la discriminación de masas para la medida de la composición isotópica específica de las especies de mercurio por cromatografía de gases acoplada a ICP-MS de tipo multicolector**



### D.3.1. Introducción

Como se mencionó ya varias veces a lo largo del manuscrito, el Hg es un contaminante global que representa un riesgo para el medio ambiente y los seres humanos debido a su elevada toxicidad.<sup>185</sup> En las últimas décadas, la medida de los isótopos de Hg surgió como valiosa herramienta para comprender el ciclo biogeoquímico del Hg y sus fuentes de contaminación.<sup>186</sup> La determinación de las diferentes especies de Hg en una muestra puede resultar muy útil para comprender la reactividad, movilidad y bioacumulación del Hg en función de su forma química.

El Hg tiene siete isótopos estables que pueden sufrir MDF y/o MIF durante diferentes procesos biogeoquímicos<sup>187,188, 189, 190, 191</sup> El MIF de los isótopos impares del Hg es principalmente el resultado de dos mecanismos: el efecto del espín magnético y el efecto del volumen nuclear (secciones **A.3.2.2.** y **A.3.2.1.**). Por otro lado, el MDF proporciona información sobre las transformaciones que sufre el elemento. Los valores asociados al MDF y MIF de los isótopos de Hg se expresan en notación delta ( $\delta^{xxx}\text{Hg}$  o  $\Delta^{xxx}\text{Hg}$ , respectivamente).

---

<sup>185</sup> Xu, J., Buck, M., Eklöf, K., Ahmed, O. O., Schaefer, J. K., Bishop, K., Skjellberg U., Björn E., Bertilsson S., Bravo, A. G., 2019. Mercury methylating microbial communities of boreal forest soils. Scientific reports, 9(1), 518.

<sup>186</sup> Bank, M. S. (Ed.), 2012. Mercury in the environment: pattern and process. Univ of California Press, 55-72.

<sup>187</sup> Young, E. D., Galy, A., Nagahara, H., 2002. Kinetic and equilibrium mass-dependent isotope fractionation laws in nature and their geochemical and cosmochemical significance. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(6), 1095-1104.

<sup>188</sup> Buchachenko, A. L., 2001. Magnetic isotope effect: Nuclear spin control of chemical reactions. *The Journal of Physical Chemistry A*, 105(44), 9995-10011.

<sup>189</sup> Bigeleisen, J. 1996. Temperature dependence of the isotope chemistry of the heavy elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9393-9396.

<sup>190</sup> Schauble, E. A., 2007. Role of nuclear volume in driving equilibrium stable isotope fractionation of mercury, thallium, and other very heavy elements. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(9), 2170-2189.

<sup>191</sup> Sonke, J. E., 2011. A global model of mass independent mercury stable isotope fractionation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 75(16), 4577-4590.

## Resultados

---

Las relaciones isotópicas del HgT pueden medirse con precisión y exactitud mediante CVG-MC-ICP-MS, pero para la medida de las relaciones isotópicas específicas de las especies de Hg se requiere del acoplamiento de técnicas cromatográficas a un MC-ICP-MS, como la cromatografía de gases. En este caso, la medida de las  $R_i$  se realiza en un corto período de tiempo (2-5 segundos)<sup>105</sup>, por lo que la reproducibilidad externa de los valores  $\delta$  específicos de las especies de Hg se ve afectada. La naturaleza transiente de las señales lleva por tanto asociadas desviaciones estándar de las relaciones isotópicas entre dos y cinco veces más altas que las obtenidas al medir señales continuas.<sup>192</sup>

La medida de las relaciones isotópicas mediante MC-ICP-MS suele verse afectada por los efectos de la discriminación de masas, que provocan desviaciones con respecto a las  $R_i$  reales de la muestra.<sup>82</sup> Este efecto tiene como resultado una transmisión preferencial de los isótopos más pesados frente a los más ligeros, lo que afecta significativamente la precisión y la exactitud de las medidas de las  $R_i$ . La discriminación de masas tiene lugar en la interfase entre la fuente de ICP y el analizador de masas, debido al efecto *nozzle* y al efecto espacio-carga.<sup>193</sup> Se han propuesto dos métodos principalmente para corregir los efectos de la discriminación de masas: i) una corrección externa basada en la medida de las  $R_i$  de un estándar de referencia entre muestras y ii) una corrección interna basada en la medida simultánea de las  $R_i$  de la muestra y un estándar de referencia previamente añadido a la muestra.<sup>82</sup> El efecto causado por el fenómeno de la discriminación de masas en la medida de las  $R_i$  no es constante ni estable, ya que fluctúa a lo largo del análisis.<sup>54</sup> Esto significa que se necesita realizar una corrección continua del efecto, como por ejemplo con la introducción en línea de

---

<sup>192</sup> Epov, V. N., Berail, S., Jimenez-Moreno, M., Perrot, V., Pecheyran, C., Amouroux, D., Donard, O. F., 2010. Approach to measure isotopic ratios in species using multicollector-ICPMS coupled with chromatography. *Analytical chemistry*, 82(13), 5652-5662.

<sup>193</sup> Ingle, C. P., Sharp, B. L., Horstwood, M. S., Parrish, R. R., Lewis, D. J., 2003. Instrument response functions, mass bias and matrix effects in isotope ratio measurements and semi-quantitative analysis by single and multi-collector ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18(3), 219-229.

otro elemento de masa similar al medido. Los modelos de corrección se basan en el cálculo de un factor de corrección, obtenido comparando la  $R_i$  medida con la  $R_i$  teórica en un patrón de referencia, aplicando diferentes métodos matemáticos de ajuste, como la ley lineal, la ley de la potencia, la ley exponencial, la ley de Russell y los modelos revisados de Russell.<sup>106,194</sup> Entre estos métodos, el modelo exponencial y el modelo de Russell son los más utilizados para las medidas por MC-ICP-MS. Cabe destacar que estos modelos se han desarrollado para corregir efectos del MDF. No obstante, un estudio relativamente reciente ha reportado MIF instrumental para la medida de las  $R_i$  de osmio por MC-ICP-MS.<sup>195</sup> En el caso de la medida de las  $R_i$  específicas de las especies en señales transientes, el bajo número de puntos de adquisición dificulta la detección del MIF instrumental.<sup>106</sup>

Tanto la precisión como la exactitud de las relaciones isotópicas específicas de las especies mejoran cuando se calculan a partir de la pendiente de la regresión lineal entre dos señales isotópicas, frente a cuando se calculan como el promedio de la relación isotópica de los puntos de los datos individuales a lo largo de la señal transiente. Esta estrategia fue desarrollada por primera vez por Fietzke *et al.*<sup>196</sup> para ablación láser acoplada a MC-ICP-MS y posteriormente aplicada por Epov *et al.*<sup>192</sup> para la medida de las  $R_i$  específicas de Hg por GC-MC-ICP-MS. En trabajos previos se reportó una reproducibilidad externa de los valores  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  de las especies de Hg por GC-MC-ICP-MS inferior a 0,5‰ (expresado como 2SD).<sup>50,192</sup>

---

<sup>194</sup> Yang, L., Tong, S., Zhou, L., Hu, Z., Mester, Z., Meija, J., 2018. A critical review on isotopic fractionation correction methods for accurate isotope amount ratio measurements by MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33(11), 1849-1861.

<sup>195</sup> Zhu, Z., Meija, J., Tong, S., Zheng, A., Zhou, L., Yang, L., 2018. Determination of the isotopic composition of osmium using MC-ICPMS. *Analytical chemistry*, 90(15), 9281-9288.

<sup>196</sup> Fietzke, J., Liebetrau, V., Günther, D., Gürs, K., Hametner, K., Zumholz, K., Hansteena, T.H., Eisenhauer, A. 2008. An alternative data acquisition and evaluation strategy for improved isotope ratio precision using LA-MC-ICP-MS applied to stable and radiogenic strontium isotopes in carbonates. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23(7), 955-961.

Normalmente, para el cálculo de los valores  $\delta$  específicos de las especies de Hg se utiliza la estrategia "Standard-Sample-Bracketing" SSB y para la corrección interna de la discriminación de masas se nebuliza de manera continua una solución de Tl para la medida de la  $R_i$   $^{205}\text{Tl}/^{203}\text{Tl}$ . En el caso de GC-MC-ICP-MS, la disolución de Tl nebulizada se mezcla de manera continua con el flujo de argón, que transporta los analitos gaseosos que eluyen del GC. La elución de la matriz de la muestra de la columna cromatográfica puede inducir ciertas inestabilidades en el plasma, que afectan a la discriminación de masas del perfil del pico cromatográfico de los compuestos de Hg. Planteamientos previos asumen que esas inestabilidades afectan de manera igual tanto al Hg como al Tl por lo que, el modelo de Russell (protocolo de corrección más ampliamente utilizado para medida de las  $R_i$  de Hg de alta precisión y exactitud) utiliza como referencia la relación isotópica  $^{205}\text{Tl}/^{203}\text{Tl}$ . Este modelo ha sido revisado por Baxter y colaboradores<sup>114</sup>, quienes han desarrollado una nueva ecuación en la que la corrección de la discriminación de masas se realiza considerando todo el conjunto de los datos obtenidos y no solo los estándares medidos antes y después de la muestra.

A pesar de la importancia de la corrección de la discriminación de masas, los planteamientos publicados hasta ahora no han evaluado su efecto en la medida de las  $R_i$  de las especies de Hg calculadas a partir de la pendiente de la regresión lineal entre dos señales isotópicas.

### D.3.2. Objetivos

Este capítulo se comparan diferentes modelos de corrección del fenómeno de la discriminación de masas para la medida de la composición isotópica específica de las especies de mercurio por GC-MC-ICP-MS. Este objetivo general se dividió en los siguientes objetivos parciales:

- Análisis en diferentes sesiones de medida del estándar primario NIST 3133 frente a NIST 3133 mediante GC-MC-ICP-MS.
- Análisis en diferentes sesiones de medida del estándar secundario NIST RM-8610 (anteriormente UM-Almadén) frente a NIST 3133 mediante GC-MC-ICP-MS.
- Evaluación de la exactitud y la precisión de los valores de las  $R_i$  y de los  $\delta$  específicos del Hg(II) obtenidos mediante GC-MC-ICP-MS para la comparación de los diferentes modelos de corrección de la discriminación de masas.
- Evaluación de dos protocolos para la medida de los valores  $\delta$  específicos de Hg(II) (SSB tradicional y el procedimiento de *bracketing* propuesto por Baxter *et al.*<sup>114</sup>).

### D.3.3. Experimental

#### D.3.3.1. Instrumentación

Los equipos utilizados a lo largo de este capítulo ya han sido descritos en el Experimental general (apartados **C.1.2.** y **C.1.3.**)

Se utilizó el equipo MC-ICP-MS Thermo Neptune (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) instalado en los Servicios Científico-Técnicos de la Universidad de Oviedo, acoplado a un GC Agilent 6890N (Agilent Technologies, Tokio, Japón). Las condiciones de operación del GC-MC-ICP-MS se muestran en la **Tabla 6** y la **Tabla 7**. En la sección **C.1.3.2.** se describe la disposición experimental de ambos equipos. Se usaron también la balanza analítica Mettler Toledo MS205DU para pesar las muestras y los estándares y el medidor de pH Basic 20 CRISON (Alella, Barcelona, España) para ajustar el pH de la solución reguladora.

#### D.3.3.2. Materiales y reactivos

El material y los reactivos utilizados están recogidos en la sección **C.2.** del Experimental general. En este capítulo se utilizaron el  $\delta$ -cero estándar NIST SRM-3133 y el estándar secundario NIST RM-8610 (UM-Almadén). El estándar de Tl utilizado para la corrección interna de la discriminación de masas se obtuvo de Absolute Standards Inc. (Hamden, CT, E.E.U.U.). La derivatización de los compuestos se realizó, al igual que en el capítulo anterior, con una disolución al 2% en volúmen de tetra-n-etilborato de sodio.

### D.3.3.3. Procedimientos

Tanto la preparación de las muestras para la medida de las  $R_i$  específicas de Hg(II), como la medida en sí de dichas  $R_i$ , han sido detalladas en las secciones **C.3.4.1.** y **C.3.7.1.**, respectivamente.

En lo que respecta al tratamiento de datos, las  $R_i$  se calcularon mediante LRS (apartado **C.3.7.4.**) y se corrigió el desfase temporal entre las copas de Faraday (apartado **C.3.7.3.**).

Para la corrección del fenómeno de la discriminación de masas se nebulizó una disolución de Tl utilizando un nebulizador microconcéntrico y una cámara de nebulización ciclónica. El aerosol de Tl se mezcló a través de una pieza en Y con el flujo de Ar que transporta los analitos gaseosos, seleccionándose la concentración de la disolución de Tl para que el voltaje del  $^{205}\text{Tl}$  y el voltaje del pico máximo del  $^{202}\text{Hg}$  fueran coincidentes en un 10%. La relación isotópica  $^{205}\text{Tl}/^{203}\text{Tl}$  también se calculó mediante LRS. En este caso, dado que la señal de Tl es constante, se asumió 0 como ordenada en el origen y se calculó la pendiente (b) de acuerdo con la ecuación<sup>197</sup>:

$$V^{205} = b \times V^{203} \quad (42)$$

---

<sup>197</sup> Rodríguez-Castrillón, J. Á., García-Ruiz, S., Moldovan, M., Alonso, J. I. G., 2012. Multiple linear regression and on-line ion exchange chromatography for alternative Rb–Sr and Nd–Sm MC-ICP-MS isotopic measurements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 27(4), 611-618.

Este procedimiento permite determinar los residuales del ajuste lineal entre las señales de  $^{205}\text{Tl}$  y  $^{203}\text{Tl}$ , lo que podría indicar posibles efectos de la matriz en la discriminación de masas, que tienen lugar durante la elución de los picos cromatográficos de mercurio.

Se emplearon dos modelos para corregir el fenómeno de la discriminación de masas: el modelo de Russell en combinación con SSB y el modelo revisado de Baxter.

La corrección de la discriminación de masas mediante el modelo de Russell se llevó a cabo utilizando la ecuación (43):

$$\left(\frac{\text{XXX}_{\text{Hg}}}{198_{\text{Hg}}}\right)_{\text{corregido}} = \left(\frac{\text{XXX}_{\text{Hg}}}{198_{\text{Hg}}}\right)_{\text{medido}} \times \left(\frac{w^{\text{XXX}}}{w^{198}}\right)^k \quad (43)$$

donde XXX son los isótopos de Hg desde 199 hasta 202, W la masa isotópica del correspondiente y k el factor de corrección de la discriminación de masas, calculado utilizando la ecuación (44):

$$k = \frac{\log\left(\frac{\left(\frac{^{205}\text{Tl}}{^{203}\text{Tl}}\right)_{\text{teórico}}}{\left(\frac{^{205}\text{Tl}}{^{203}\text{Tl}}\right)_{\text{medido}}}\right)}{\log\left(\frac{w^{205}}{w^{203}}\right)} \quad (44)$$

En la ecuación (44), la relación isotópica teórica  $^{205}\text{Tl}/^{203}\text{Tl}$  puede adoptar cualquier valor, ya que esto no afecta los valores delta calculados a partir de las relaciones isotópicas de mercurio corregidas. En este estudio, se utilizó el valor teórico de 2,387075 basado en la abundancia natural del talio según la IUPAC.

## Resultados

---

Para la determinación de las relaciones isotópicas absolutas de Hg del estándar NIST RM-8610 (UM-Almadén) utilizando el modelo de Russell y SSB, se calculó un factor de corrección (f) utilizando las abundancias absolutas publicadas por el NRCC en el estándar NIST 3133<sup>198</sup>, utilizando la ecuación (45).

$$f = \left( \frac{\left( \frac{XXX_{Hg}}{198_{Hg}} \right)_{\text{Referencia NIST 3133}}}{\left( \frac{XXX_{Hg}}{198_{Hg}} \right)_{\text{Media corregida NIST}}} \right) \quad (45)$$

donde la expresión  $\left( \frac{XXX_{Hg}}{198_{Hg}} \right)_{\text{Media corregida NIST}}$  corresponde al promedio de las  $R_i$  corregidas por la discriminación de masas (ecuación (43)) medidas justo antes y después de la muestra de Almadén. Finalmente, las relaciones corregidas de NIST RM-8610 se calcularon utilizando la ecuación (46):

$$\left( \frac{XXX_{Hg}}{198_{Hg}} \right)_{\text{NIST RM-8610 corregido}} = \left( \frac{XXX_{Hg}}{198_{Hg}} \right)_{\text{NIST RM-8610 medido}} \cdot f \quad (46)$$

Por otro lado, el modelo de corrección de la discriminación de masas propuesto por Baxter *et al.*<sup>114</sup> determina la relación lineal entre el logaritmo natural de las  $R_i$  del mercurio y el logaritmo natural de las  $R_i$  del talio medidas para todo el conjunto de datos utilizando el estándar de referencia NIST SRM-3133, como se muestra en la ecuación (47):

$$\text{Ln} \left( \frac{XXX_{Hg}}{198_{Hg}} \right)_{\text{NIST 3133 medido}} = a + b \times \text{Ln} \left( \frac{205_{Tl}}{203_{Tl}} \right)_{\text{medido}} \quad (47)$$

---

<sup>198</sup> Meija, J., Yang, L., Sturgeon, R. E., Mester, Z., 2010. Certification of natural isotopic abundance inorganic mercury reference material NIMS-1 for absolute isotopic composition and atomic weight. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25(3), 384-389.

Los valores  $a$  y  $b$  pueden utilizarse directamente para el cálculo de los valores delta, como se verá a continuación. Se ha de tener en cuenta que estos valores  $a$  y  $b$  varían en función de la relación isotópica de Hg medida.

Para la determinación de las  $R_i$  absolutas de Hg del estándar NIST RM-8610 utilizando el modelo de Baxter, se calculó un factor de corrección ( $f$ ) utilizando las abundancias absolutas publicadas por el NRCC para el estándar NIST SRM-3133<sup>198</sup>, empleando la ecuación (48):

$$f = \left( \frac{\left( \frac{XXX_{Hg}}{198_{Hg}} \right)_{\text{Referencia NIST SRM-3133}}}{\exp \left( a + b \times \ln \left( \frac{205_{Tl}}{203_{Tl}} \right)_{\text{NIST RM-8610 medido}} \right)} \right) \quad (48)$$

Finalmente, las relaciones corregidas del NIST RM-8610 se calcularon utilizando la ecuación (49):

$$\left( \frac{XXX_{Hg}}{198_{Hg}} \right)_{\text{NIST 8610 corrected}} = \left( \frac{XXX_{Hg}}{198_{Hg}} \right)_{\text{NIST 8610 measured}} \cdot f \quad (49)$$

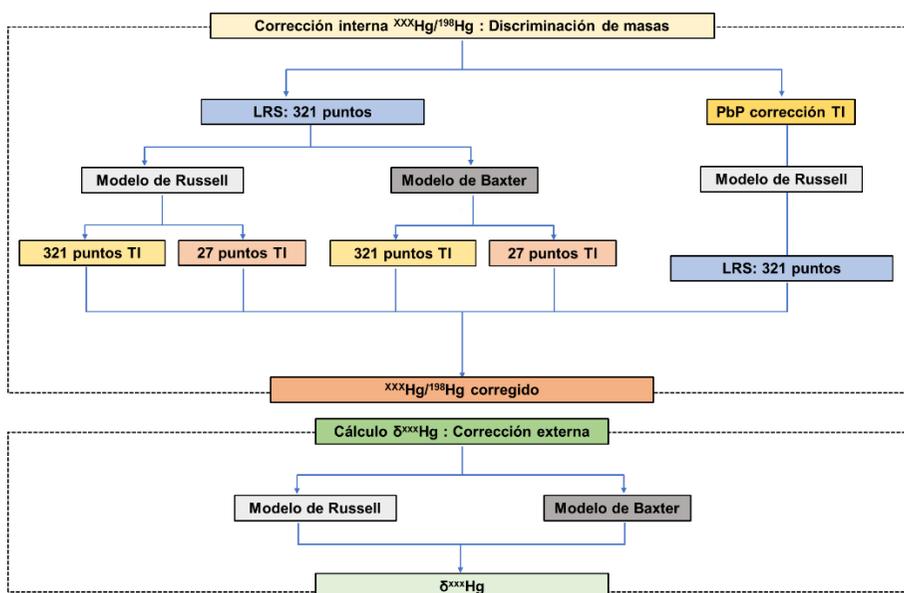
La  $R_i$  de Tl para la corrección de la discriminación de masas se calculó utilizando tres estrategias diferentes: 1) LRS utilizando 321 puntos de adquisición de Tl (160 puntos de adquisición antes y después del pico máximo), 2) LRS utilizando 27 puntos de adquisición de Tl (13 puntos de adquisición antes y después del pico máximo), y 3) el método PbP para 321 puntos de adquisición. La **Figura 51** proporciona una visión general de las diferentes estrategias seguidas para la corrección de la discriminación de masas y para el cálculo de los valores delta.

El cálculo mediante el método de PbP solo se evaluó utilizando el modelo de Russell mediante la ecuación (42). Se obtuvo un factor de corrección ( $f$ ) y, por tanto, una  $R_i$  corregida para cada punto de adquisición del cromatograma. Para

## Resultados

el cálculo de la  $R_i$  de Hg mediante LRS, los voltajes corregidos ( $V_{\text{corregido}}^{\text{XXX}}$ ) para los isótopos desde  $^{199}\text{Hg}$  hasta  $^{202}\text{Hg}$  se obtuvieron a partir de los valores  $V^{198}$  no corregidos mediante la ecuación (50).

$$V_{\text{corregido}}^{\text{XXX}} = \left( \frac{\text{XXX}_{\text{Hg}}}{198_{\text{Hg}}} \right)_{\text{corregido (Pbp)}} \cdot V^{198} \quad (50)$$



**Figura 51.** Resumen de los diferentes procedimientos de cálculo para las  $R_i$  de Hg (corrección interna) y los valores  $\delta$  específicos de las especies de Hg.

Se utilizaron dos estrategias diferentes para el cálculo de los valores  $\delta$ , tal y como se describe en la **Figura 52**: i) el modelo tradicional de SSB utilizando las relaciones isotópicas corregidas por TI, y ii) el modelo propuesto por Baxter *et al.*<sup>114</sup> En ambos casos, se utilizó el material de referencia NIST SRM-3133 como estándar  $\delta$ -cero.

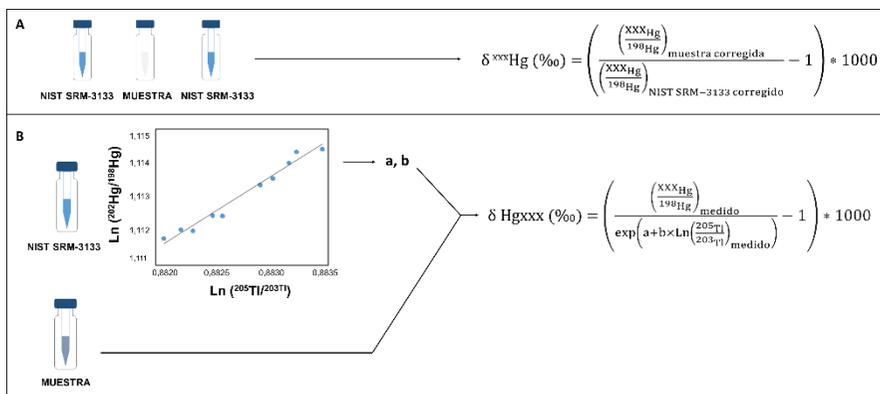


Figura 52. Cálculo de los valores  $\delta$ . a) SSB y b) Modelo propuesto por Baxter *et al.*<sup>114</sup>

Al aplicar SSB, los valores  $\delta$  se calcularon como se describe en la ecuación

(51):

$$\delta^{XXX}\text{Hg} (\text{‰}) = \left( \frac{\left( \frac{\text{XXXHg}}{199\text{Hg}} \right)_{\text{muestra corregida}}}{\left( \frac{\text{XXXHg}}{198\text{Hg}} \right)_{\text{NIST SRM-3133 corregido}}} - 1 \right) * 1000 \quad (51)$$

donde XXX hace referencia a la masa de los isótopos entre  $^{199}\text{Hg}$  y  $^{202}\text{Hg}$ . La relación isotópica del estándar NIST SRM-3133 se calculó a partir del promedio de las relaciones isotópicas corregidas por TI medidas justo antes y después de la muestra. La concentración del estándar se ajustó para que coincidiera con la intensidad de la muestra en torno al 10%.

Cuando se aplica el modelo propuesto por Baxter, los valores  $\delta$  se calcularon como se describe en la ecuación (52) a partir de las relaciones isotópicas de Hg y TI medidas en la muestra:

$$\delta \text{Hg}^{XXX} (\text{‰}) = \left( \frac{\left( \frac{\text{XXXHg}}{199\text{Hg}} \right)_{\text{medido}}}{\exp\left(a+b \times \text{Ln}\left(\frac{205\text{Tl}}{203\text{Tl}}\right)_{\text{medido}}\right)} - 1 \right) * 1000 \quad (52)$$

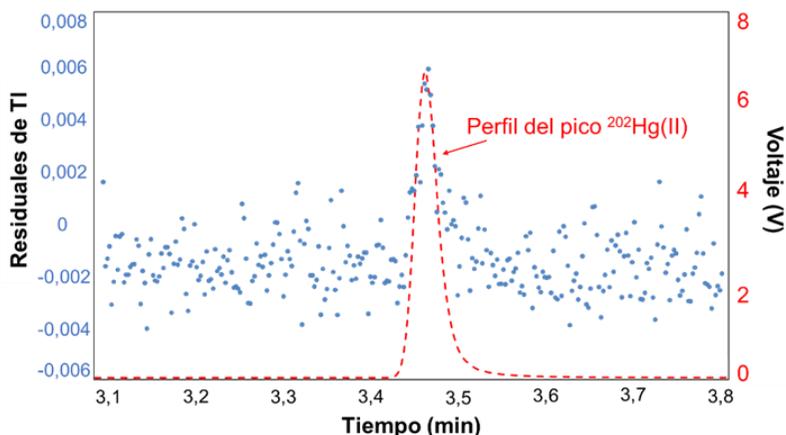
Es importante destacar que en la ecuación (52), la expresión  $\exp\left(a + b \times \ln\left(\frac{^{205}\text{Tl}}{^{203}\text{Tl}}\right)_{\text{medido}}\right)$  corresponde al valor NIST SRM-3133 que "se habría medido" para esta muestra en concreto, de acuerdo a los valores  $a$  y  $b$  obtenidos de la ecuación (47).

### D.3.4. Resultados y discusión

#### D.3.4.1. Evaluación de la variación de la discriminación de masas a lo largo del perfil de elución cromatográfica

La corrección de la discriminación de masas de la  $R_i$  específica del Hg(II) obtenida por GC-MC-ICP-MS generalmente se lleva a cabo midiendo la relación isotópica  $^{205}\text{Tl}/^{203}\text{Tl}$ . A tal fin, se mezcla una disolución de Tl nebulizada con el flujo de Ar que transporta los compuestos eluidos de la columna del GC. La elución de la matriz de la muestra o incluso de los analitos puede inducir inestabilidades en el plasma, que afectan a la discriminación de masas de los perfiles del pico cromatográfico.

La **Figura 53** muestra la variación de los residuales de la relación isotópica  $^{205}\text{Tl}/^{203}\text{Tl}$  calculada a partir de la pendiente de la regresión lineal entre ambas señales de Tl a lo largo de la elución del pico de Hg(II).



**Figura 53.** Distorsión de los residuales de TI durante la elución de Hg(II). Los puntos azules corresponden a los valores de los residuales de TI, mientras que el perfil del pico de  $^{202}\text{Hg}$  se representa en rojo.

En el gráfico se puede observar cómo los residuales de la regresión lineal muestran variaciones al azar, excepto cuando eluye el Hg(II) de la columna del GC, momento en el cual se observa una pequeña variación del factor de la discriminación de masas. En consecuencia, el rango de puntos de adquisición de TI seleccionado para la corrección de la discriminación de masas puede afectar los valores de las  $R_i$  corregidos y a los valores  $\delta$  finales. Es debido a esto que se decidió comparar dos intervalos de TI para la corrección de la discriminación de masas: el perfil completo de 321 puntos de adquisición, al igual que el seleccionado por Queipo-Abad *et al.*<sup>105</sup>, y un intervalo más estrecho de 27 puntos de TI, que cubre solo el perfil del pico de Hg(II).

Además, se evaluó también el efecto de diferentes procedimientos de corrección de la discriminación de masas (Russell con SSB y Baxter) estudiando la precisión y exactitud de las  $R_i$  específicas de Hg(II) y los valores  $\delta$  obtenidos por GC-MC-ICP-MS. Para facilitar la normalización y la comparación de los resultados con otros laboratorios, se calcularon los valores  $\delta$  y sus incertidumbres asociadas siguiendo las pautas propuestas por Blum y Bergquist<sup>64</sup> para reportar las variaciones en la composición isotópica natural del Hg. Según estudios previos,

## Resultados

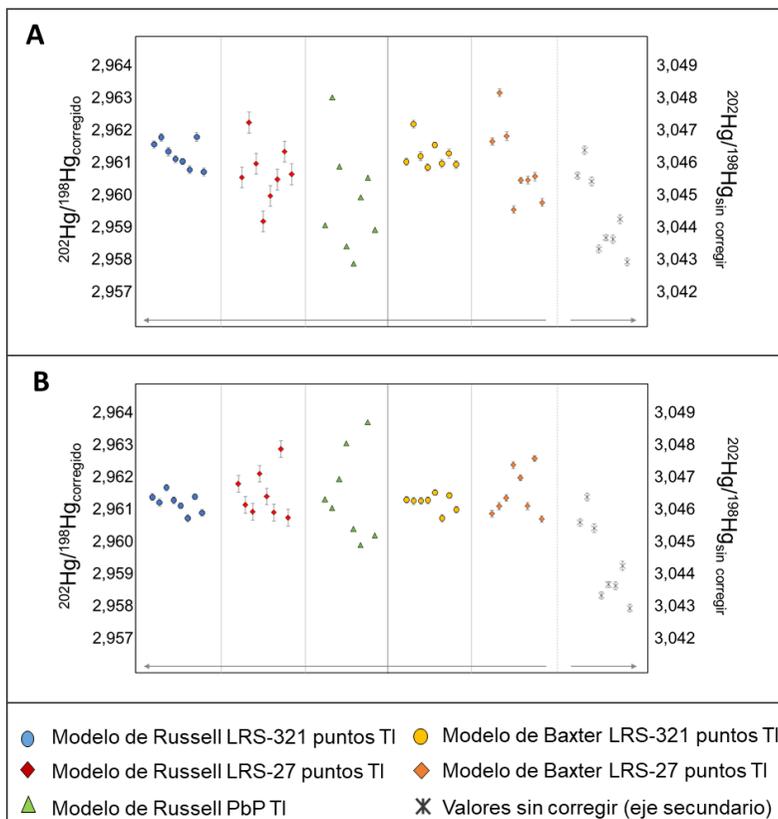
---

para que la precisión externa de los valores  $\delta$  específicos de las especies sea aceptable debe ser inferior a  $0,5 \text{ 2SD}$ .<sup>105</sup>

El conjunto de datos completo evaluado se obtuvo en 6 sesiones de medida. En tres de estas sesiones se midió únicamente el NIST SRM-3133 ( $n=17$ ,  $n=21$  y  $n=15$ ) para evaluar la precisión interna de la relación isotópica de mercurio y los valores delta 0. Las tres sesiones siguientes se llevaron a cabo realizando *bracketing*  $n=8$  con el estándar de mercurio NIST RM-8610 Almadén y  $n=9$  NIST SRM-3133, para evaluar tanto las relaciones isotópicas absolutas de mercurio como los valores delta para este material de referencia.

D.3.4.2. Evaluación del procedimiento de corrección de la discriminación de masas en la precisión interna de las medidas de las  $R_i$  específicas de Hg(II) por GC-MC-ICP-MS

La **Figura 54** muestra las relaciones isotópicas  $^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$  sin corregir y corregidas por la discriminación de masas utilizando los modelos de corrección de Russell y Baxter obtenidos en dos sesiones de medida independientes del NIST RM-8610 frente a NIST SRM-3133 (**Figura 54 a y b**). Las relaciones isotópicas se corrigieron aplicando tres procedimientos diferentes detallados en la sección Procedimientos (**D.3.3.3.**), tanto por Russell como por Baxter: i) LRS utilizando 321 puntos de adquisición de TI, ii) LRS utilizando 27 puntos de adquisición de TI y iii) método PbP con 321 puntos de adquisición (solo por Russell). En la **Tabla 27** se muestran todas las relaciones isotópicas individuales específicas de Hg(II) obtenidas en tres sesiones de medida diferentes para el NIST RM-8610, las precisiones internas se expresan como 2SE.



**Figura 54.**  $R_i$   $^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$  para el NIST RM-8610 ( $n=8$ ) obtenida en dos sesiones de medida: a) Sesión 1 y b) Sesión 2. Las incertidumbres para cada valor de la  $R_i$  se corresponden con 2SE obtenidas en el cálculo de la relación isotópica. Los valores no corregidos están referidos al eje secundario.

Según la **Figura 54**, al aplicar el modelo de corrección de Russell, la mayor variabilidad de los valores de la  $R_i$  se observa con el método PbP. Respecto a las  $R_i$  corregidas utilizando el modelo de Baxter, únicamente se analizan los resultados obtenidos por LRS, ya que, como se explicó en la sección Procedimientos (**D.3.3.3.**), Baxter no se aplica a los resultados obtenidos con el método PbP.

**Tabla 27.** Valores medios de las R del NIST RM-8610 y de precisión interna expresados como  $\pm 2SE$  calculados con Russell y Baxter para tres sesiones de medida independientes con tres modelos diferentes de corrección de la discriminación de masas: 1) 321 puntos de adquisición de TI, 2) 27 puntos de adquisición de TI y 3) Pbp.

Corrección de la discriminación de masas		Russell			Baxter		
Cálculo de la discriminación de masas con TI		LRS-321 TI	LRS-27 TI	PbP – 321 TI	LRS-321 TI	LRS-27 TI	
Sesión 1 (n=8)	<sup>199/198</sup> Hg	1,6871 $\pm$ 0,0005	1,6870 $\pm$ 0,0007	1,6869 $\pm$ 0,0008	1,6871 $\pm$ 0,0002	1,6871 $\pm$ 0,0003	
	<sup>200/198</sup> Hg	2,3042 $\pm$ 0,0008	2,3040 $\pm$ 0,0011	2,3037 $\pm$ 0,0014	2,3042 $\pm$ 0,0005	2,3042 $\pm$ 0,0005	
	<sup>201/198</sup> Hg	1,3114 $\pm$ 0,0005	1,3112 $\pm$ 0,0008	1,3109 $\pm$ 0,0013	1,3114 $\pm$ 0,0003	1,3111 $\pm$ 0,0005	
	<sup>202/198</sup> Hg	2,9611 $\pm$ 0,0008	2,9605 $\pm$ 0,0018	2,9597 $\pm$ 0,0033	2,9611 $\pm$ 0,0003	2,9608 $\pm$ 0,0009	
Sesión 2 (n=8)	<sup>199/198</sup> Hg	1,6868 $\pm$ 0,0005	1,6869 $\pm$ 0,0005	1,6868 $\pm$ 0,0006	1,6868 $\pm$ 0,0002	1,6869 $\pm$ 0,0002	
	<sup>200/198</sup> Hg	2,3044 $\pm$ 0,0008	2,3045 $\pm$ 0,0012	2,3045 $\pm$ 0,0006	2,3044 $\pm$ 0,0003	2,3045 $\pm$ 0,0004	
	<sup>201/198</sup> Hg	1,3114 $\pm$ 0,0003	1,3115 $\pm$ 0,0006	1,3115 $\pm$ 0,0015	1,3114 $\pm$ 0,0001	1,3116 $\pm$ 0,0002	
	<sup>202/198</sup> Hg	2,9610 $\pm$ 0,0006	2,9613 $\pm$ 0,0015	2,9613 $\pm$ 0,0027	2,9610 $\pm$ 0,0002	2,9613 $\pm$ 0,0005	
Sesión 3 (n=8)	<sup>199/198</sup> Hg	1,6871 $\pm$ 0,0008	1,6871 $\pm$ 0,0007	1,6871 $\pm$ 0,0007	1,6871 $\pm$ 0,0003	1,6871 $\pm$ 0,0003	
	<sup>200/198</sup> Hg	2,3044 $\pm$ 0,0010	2,3044 $\pm$ 0,0009	2,3043 $\pm$ 0,0012	2,3045 $\pm$ 0,0004	2,3044 $\pm$ 0,0003	
	<sup>201/198</sup> Hg	1,3114 $\pm$ 0,0005	1,3114 $\pm$ 0,0006	1,3113 $\pm$ 0,0012	1,3115 $\pm$ 0,0002	1,3115 $\pm$ 0,0002	
	<sup>202/198</sup> Hg	2,9612 $\pm$ 0,0014	2,9611 $\pm$ 0,0013	2,9608 $\pm$ 0,0032	2,9613 $\pm$ 0,0004	2,9611 $\pm$ 0,0005	

Basándonos en la **Tabla 27**, para ambos modelos de corrección, los mejores valores de precisión interna se obtuvieron al aplicar LRS con 321 puntos de adquisición de TI (variando de 0,0002 a 0,0014). Cuando se aplicó LRS con 27 puntos de adquisición de TI, la precisión interna de la  $R_i$   $^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$  fluctuó entre 0,0013 y 0,0018 al usar el modelo de Russell y entre 0,0005 y 0,009 al usar el modelo de Baxter (**Tabla 27**). El resto de las relaciones isotópicas mostraron una precisión interna dentro del rango de 0,0005-0,0011 al usar el modelo de Russell y dentro del rango de 0,0002-0,0005 al usar el modelo de Baxter. El método LRS considerando 321 puntos de adquisición de TI y utilizando el modelo de Russell proporcionó, en general, valores de 2SE más bajos que cuando se usaron 27 puntos de adquisición de TI para todas las  $R_i$  del Hg(II). Cuando se aplicó el método de corrección PbP, los valores de 2SE para la  $R_i$   $^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$  oscilaron entre 0,0027 y 0,0033 (**Tabla 27**), y entre 0,0006 y 0,0015 para el resto de las  $R_i$  de Hg(II). Esto puede explicarse con la variación en las  $R_i$  de TI durante la elución del Hg(II), como se describe en la **Figura 53**. Por lo tanto, se demuestra que la corrección de la discriminación de masas para las relaciones isotópicas de mercurio no se ve afectada por las variaciones en las  $R_i$  de TI durante la elución de los picos de Hg(II).

La **Tabla 28** muestra el promedio de las  $R_i$  de mercurio corregidas por la discriminación de masas de 24 medidas independientes de 3 sesiones diferentes para el NIST RM-8610.

**Tabla 28.** Relaciones isotópicas  $^{200}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$  y precisión interna expresada como  $\pm 2\text{SE}$  obtenidas con las correcciones de Russell y Baxter para el NIST RM-8610 de tres sesiones de medida ( $n=24$ ) con tres modelos diferentes de corrección de la discriminación de masas: 1) LRS con 321 puntos de adquisición de TI, 2) LRS con 27 puntos de adquisición de TI y 3) PbP con 321 puntos de adquisición de TI.

Modelo de corrección de la discriminación de masas		Russell			Baxter		
Procedimiento de cálculo de la discriminación de masas con TI							
NIST RM 8610 (n=24)	$^{199/198}\text{Hg}$	LRS-321 TI	LRS-27 TI	PbP - 321 TI	LRS-321 TI	LRS-27 TI	
		1,6870 $\pm$ 0,0007	1,6870 $\pm$ 0,0006	1,6869 $\pm$ 0,0007	1,6870 $\pm$ 0,0007	1,6870 $\pm$ 0,0007	1,6870 $\pm$ 0,0007
	$^{200/198}\text{Hg}$	2,3043 $\pm$ 0,0009	2,3043 $\pm$ 0,0011	2,3041 $\pm$ 0,0015	2,3043 $\pm$ 0,0011	2,3044 $\pm$ 0,0011	2,3044 $\pm$ 0,0011
	$^{201/198}\text{Hg}$	1,3114 $\pm$ 0,0004	1,3113 $\pm$ 0,0007	1,3112 $\pm$ 0,0012	1,3114 $\pm$ 0,0006	1,3114 $\pm$ 0,0010	
	$^{202/198}\text{Hg}$	2,9611 $\pm$ 0,0010	2,9610 $\pm$ 0,0017	2,9606 $\pm$ 0,0033	2,9611 $\pm$ 0,0009	2,9610 $\pm$ 0,0018	

Como se puede observar, los valores promedio para todas las relaciones isotópicas medidas fueron iguales estadísticamente utilizando todos los modelos de corrección diferentes. Los valores de 2SE de los dos modelos de corrección también resultaron ser comprobables siendo 321 puntos de adquisición los que proporcionan los mejores valores de precisión. El modelo PbP muestra un rendimiento inferior.

En resumen, los resultados muestran que el modelo de corrección para la discriminación de masas clásico de Russell con SSB proporciona resultados de  $R_i$  equivalentes al modelo revisado de Baxter, con una precisión interna similar. Además, como se ha observado también en trabajos anteriores<sup>105</sup>, la selección del rango adecuado de puntos de adquisición para las  $R_i$  de TI es esencial para obtener la mejor precisión interna de las  $R_i$  específicas de Hg(II).

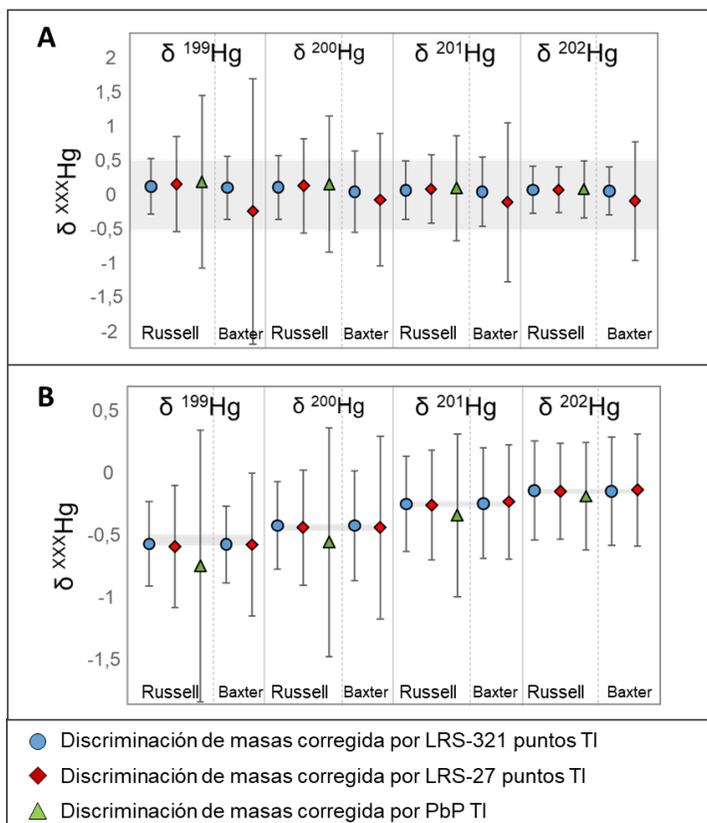
#### D.3.4.3. Evaluación de la precisión y la exactitud de los valores de $\delta$ corregidos por la discriminación de masas

La precisión externa de los valores  $\delta$  específicos de Hg(II) se expresó como dos veces la desviación estándar (2SD) de varias medidas de los valores  $\delta$  del NIST SRM-3133 frente al estándar de referencia  $\delta$ -cero NIST SRM-3133 y del NIST RM-8610 frente al estándar de referencia  $\delta$ -cero NIST SRM-3133. El cálculo de los valores  $\delta$  se realizó mediante dos estrategias diferentes: (i) SSB y (ii) Baxter. Atendiendo a trabajos anteriores, para que la precisión externa sea óptima para los valores  $\delta$  específicos de Hg(II) debe ser igual o inferior a  $\pm 0,5\%$  2SD.<sup>105,192</sup>

La **Figura 55** muestra el valor promedio  $\delta^{xxx}\text{Hg(II)}$  (‰) y la precisión externa expresada como  $\pm 2\text{SD}$  calculada con SSB y Baxter para seis sesiones de medida independientes: a)  $\delta$ -cero NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133 y b) NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133. Las **Tabla 29** y **Tabla 30** muestran los valores numéricos de la **Figura 55** correspondientes al valor promedio  $\delta^{xxx}\text{Hg(II)}$  (‰) y la precisión externa expresada como  $\pm 2\text{SD}$  para NIST SRM-3133 y NIST RM-8610,

## Resultados

respectivamente. El intervalo de  $0,0 \pm 0,5\text{‰}$  se destaca en gris en la **Figura 55a**, mientras que los valores  $\delta$  certificados ( $\pm 2\text{SD}$ ) de NIST RM-8610 se destacan en gris en la **Figura 55b**.



**Figura 55.**  $\delta^{xxx}\text{Hg(II)}$  (‰) y precisión externa expresada como  $\pm 2\text{SD}$  calculada con SSB y Baxter para seis sesiones de medida independientes. a) Valores  $\delta$ -cero de NIST SRM-3133 frente a NIST SRM-3133 (N=26). La línea gris representa el intervalo de precisión ideal de  $0,50\text{‰}$  basado en otros estudios<sup>105,196</sup>, b) patrón secundario NIST RM-8610 frente a NIST SRM-3133 (N=24). Las líneas grises representan los valores certificados ( $\pm 2\text{SD}$ ) para NIST RM-8610.

La mejor precisión externa en el cálculo de los valores  $\delta$  se obtuvo utilizando el modelo SSB tras la corrección de la discriminación de masas utilizando el modelo de Russell y LRS con 321 puntos de datos de TI, ya que la precisión externa obtenida varió entre  $0,34$  y  $0,41\text{‰}$  para el NIST SRM-3133 y entre  $0,34$  y  $0,40\text{‰}$  para el NIST RM-8610 (**Tabla 29** y **Tabla 30**). Cuando se aplicó el modelo

de Baxter, la precisión externa varió entre 0,35 y 0,46‰ para el NIST SRM-3133 y entre 0,31 y 0,44‰ para el NIST RM-8610 (**Tabla 29** y **Tabla 30**). En concordancia con los resultados de precisión interna de las  $R_i$ , se obtuvieron precisiones externas significativamente peores de los valores  $\delta$  cuando se seleccionaron 27 puntos de adquisición de TI (0,33-1,94‰) o se utilizó el modelo PbP (0,42 a 1,26‰).

**Tabla 29.** Valores  $\delta$ -cero (‰) NIST SRM-3133 medios y precisiones externas expresadas como  $\pm 2SD$  calculadas con SSB y Baxter para tres sesiones de medida independientes con tres métodos de cálculo de corrección de la discriminación de masas diferentes: 1) LRS para 321 puntos de adquisición de TI, 2) LRS para 27 puntos de adquisición de TI y 3) PbP.

Estrategia de cálculo de los valores delta		SSB			Baxter	
		Russell	Russell	Russell	Baxter	Baxter
Modelo de corrección de la discriminación de masas		LRS	LRS	PbP	LRS	LRS
Procedimiento de cálculo de la discriminación de masas con TI		321 TI	27 TI	321 TI	321 TI	27 TI
NIST SRM-3133 (n=26)	$\delta^{202}\text{Hg}$	0,07 ± 0,41	0,11 ± 0,70	0,14 ± 1,26	0,06 ± 0,46	-0,29 ± 1,94
	$\delta^{201}\text{Hg}$	0,06 ± 0,47	0,08 ± 0,69	0,11 ± 1,00	0,00 ± 0,59	-0,13 ± 0,97
	$\delta^{200}\text{Hg}$	0,02 ± 0,43	0,03 ± 0,50	0,05 ± 0,77	0,00 ± 0,50	-0,15 ± 1,16
	$\delta^{199}\text{Hg}$	0,02 ± 0,34	0,03 ± 0,33	0,03 ± 0,42	0,01 ± 0,35	-0,14 ± 0,87

La evaluación de la exactitud de los valores  $\delta$  se llevó a cabo comparando los valores  $\delta$  de referencia para el NIST RM-8610 con los valores experimentales. La **Figura 55** muestra los valores  $\delta^{202}\text{Hg}$  (‰) experimentales y la precisión externa expresada como  $\pm 2SD$  para NIST RM-8610 mientras que en la **Tabla 30** se muestran todos los valores  $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$  (‰). Se evaluaron los procedimientos de corrección de la discriminación de masas y las dos estrategias de medida (SSB y Baxter), y los resultados obtenidos concordaron con los obtenidos en la evaluación de la precisión interna de las  $R_i$ . En general, la mejor concordancia se

## Resultados

---

obtuvo para el método LRS considerando 321 puntos de adquisición de TI, independientemente del modelo aplicado (Russell o Baxter).

**Tabla 30.** Valores  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) NIST RM-8610 medios y precisiones externas expresadas como  $\pm 2\text{SD}$  calculadas con SSB y Baxter para tres sesiones de medida independientes con tres métodos de cálculo de corrección de la discriminación de masas diferentes: 1) LRS para 321 puntos de adquisición de TI, 2) LRS para 27 puntos de adquisición de TI y 3) PbP

Estrategia de cálculo de los valores delta		SSB			Baxter			Valores de referencia
<b>Modelo de corrección de la discriminación de masas</b>		Russell	Russell	Russell	Baxter	Baxter	Baxter	
<b>Procedimiento de cálculo de la discriminación de masas con TI</b>		LRS-321 TI	LRS-27 TI	PbP – 321 TI	LRS-321 TI	LRS-27 TI		
NIST RM-8610	$\delta^{202}\text{Hg}$	-0,59 ± 0,34	-0,61 ± 0,40	-0,77 ± 1,09	-0,60 ± 0,31	-0,60 ± 0,57		-0,56 ± 0,03
(n=24)	$\delta^{201}\text{Hg}$	-0,44 ± 0,35	-0,46 ± 0,46	-0,58 ± 0,92	-0,44 ± 0,44	-0,46 ± 0,74		-0,46 ± 0,02
	$\delta^{200}\text{Hg}$	-0,27 ± 0,38	-0,28 ± 0,44	-0,36 ± 0,65	-0,27 ± 0,44	-0,25 ± 0,46		-0,27 ± 0,01
	$\delta^{199}\text{Hg}$	-0,16 ± 0,40	-0,17 ± 0,38	-0,21 ± 0,43	-0,17 ± 0,44	-0,16 ± 0,45		-0,17 ± 0,01

A diferencia de la precisión externa de los valores  $\delta$ , la exactitud no se ve comprometida al disminuir el número de puntos de adquisición de TI para la corrección de la discriminación de masas, pero sí se ve comprometida al usar el método PbP. Esto refleja que la corrección tradicional de la discriminación de masas por PbP no es un método adecuado de cálculo para los valores  $\delta$  específicos de especies de Hg.

### D.3.5. Conclusiones

En este capítulo se presenta una evaluación de diferentes modelos de corrección de la discriminación de masas para la medida de relaciones isotópicas específicas de las especies en señales transientes obtenidas por GC-MC-ICP-MS.

Hasta ahora, el modelo de Russell se utilizaba como el modelo predeterminado para este tipo de medidas. Aquí se demuestra que los valores  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  se ven afectados durante la elución cromatográfica del Hg(II), ya que induce variaciones en las  $R_i$  de TI y, por lo tanto, en las  $R_i$  específicas del Hg(II) y los valores  $\delta^{xxx}\text{Hg}$ .

El método tradicional de corrección PbP ha resultado ser la peor opción para la corrección de la discriminación de masas, en términos de precisión y exactitud de las  $R_i$  específicas de Hg(II) y los valores  $\delta^{xxx}\text{Hg}$ . La precisión interna de las relaciones isotópicas específicas de Hg(II) absolutas resultó ser mejor cuando el rango de puntos seleccionados para LRS era más amplio (321 en lugar de 27), independientemente del modelo de corrección de la discriminación de masas (Russell o Baxter). Por tanto, se puede decir que en el caso de las relaciones isotópicas específicas de Hg(II), uno de los aspectos críticos en la corrección de la discriminación de masas es la selección del rango de puntos de adquisición. Esto puede estar relacionado intrínsecamente con la variación de las relaciones isotópicas de TI durante la elución del pico de Hg, como se demostró en este capítulo.

La evaluación de SSB y el procedimiento propuesto por Baxter *et al.*<sup>114</sup> mostró que ambos métodos proporcionan una precisión y exactitud similares para los  $\delta^{xxx}\text{Hg}$ . Se encontraron una precisión y exactitud ligeramente mejores en los valores  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  experimentales al aplicar el cálculo LRS en combinación con el modelo de Russell y SSB.

Este estudio resalta la importancia de revisar y evaluar diferentes protocolos para la medida y el cálculo precisos de relaciones isotópicas específicas de las especies y valores delta, no solo para el mercurio, sino también para otros elementos.



## **D.4. CAPÍTULO IV**

**Determinación de las relaciones isotópicas de mercurio inorgánico por medio de GC-MC-ICP-MS utilizando un doble trazador de  $^{199}\text{Hg}(\text{II})$  y  $^{201}\text{Hg}(\text{II})$  para la corrección interna de la discriminación de masas**



### D.4.1. Introducción

Como ya se venía comentando, el mercurio es un elemento muy tóxico presente en el medio ambiente y que puede encontrarse en el entorno de diferentes formas, como por ejemplo Hg(II), especie semivolátil, o MeHg, especie que puede bioacumularse y magnificarse a través de la cadena trófica.<sup>3,116,199</sup>

Tradicionalmente, las variaciones naturales de la composición isotópica del HgT se han estudiado por medio de MC-ICP-MS, generalmente utilizando CVG como forma de introducción de las muestras, con el objetivo de conocer más a fondo el ciclo biogeoquímico del Hg, sus fuentes de contaminación o la trayectoria del Hg en el medio ambiente.<sup>39,200,201</sup> Con el desarrollo de las técnicas de separación, como la cromatografía de gases, es posible el estudio de la composición isotópica específica de las especies de Hg, lo que permite profundizar más allá de los resultados de los trabajos sobre HgT.<sup>50,202,203,204</sup>

Como ya se vio en el capítulo anterior, el fraccionamiento isotópico natural del Hg puede tener lugar de dos maneras, dependiente de la masa (MDF) e

---

<sup>199</sup> Lamborg, C. H., Fitzgerald, W. F., O'Donnell, J., Torgersen, T., 2002. A non-steady-state compartmental model of global-scale mercury biogeochemistry with interhemispheric atmospheric gradients. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(7), 1105-1118.

<sup>200</sup> Fitzgerald, W., Lamborg, C., 2005. *Geochemistry of Mercury*. *Environmental geochemistry*, 9, 107.

<sup>201</sup> Foucher, D., Ogrinc, Hintelmann, H., 2009. Tracing mercury contamination from the Idrija mining region (Slovenia) to the Gulf of Trieste using Hg isotope ratio measurements. *Environmental Science & Technology*, 43(1), 33-39.

<sup>202</sup> Pedrero, Z., Donard, O. F., Amouroux, D., 2016. Pushing back the frontiers of mercury speciation using a combination of biomolecular and isotopic signatures: challenge and perspectives. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408, 2641-2648.

<sup>203</sup> Rodríguez-González, P., Epov, V. N., Bridou, R., Tessier, E., Guyoneaud, R., Monperrus, M., Amouroux, D., 2009. Species-specific stable isotope fractionation of mercury during Hg (II) methylation by an anaerobic bacteria (*Desulfobulbus propionicus*) under dark conditions. *Environmental science & technology*, 43(24), 9183-9188.

<sup>204</sup> Rodríguez-González, P., Epov, V. N., Pecheyran, C., Amouroux, D., Donard, O. F., 2012. Species-specific stable isotope analysis by the hyphenation of chromatographic techniques with MC-ICP-MS. *Mass spectrometry reviews*, 31(4), 504-521.

independiente de la masa (MIF), reportándose por convenio en notación delta ( $\delta^{xxx}\text{Hg}$  o  $\Delta^{xxx}\text{Hg}$ , respectivamente), frente al estándar primario NIST SRM-3133.<sup>64</sup>

Sin embargo, el estudio de la composición isotópica de las especies de Hg no es una tarea sencilla, ya que se ve muy limitado a concentraciones relativamente altas. Para poder analizar muestras con niveles de concentración de Hg bajos se utilizan varios métodos, como CVG<sup>95</sup> o las trampas de oro<sup>205</sup>, pero estos únicamente permiten el análisis de la composición isotópica del HgT. Para concentrar las especies de Hg se han propuesto también varios métodos, como la extracción selectiva, aunque además de ser un método laborioso, requiere tiempo.<sup>206,207</sup> Cuando se utiliza la GC, una buena alternativa para preconcentrar las especies de Hg es el empleo de inyectores de temperatura programada (PTV), que permiten la inyección de altos volúmenes de muestra.<sup>93,208</sup> Este tipo de inyectores admiten la introducción de volúmenes de muestra entre los 5 y los 100  $\mu\text{L}$ , lo que destaca frente a los 1 o 2  $\mu\text{L}$  inyectados normalmente en GC. Los analitos, que deben tener puntos de ebullición superiores a los del disolvente, quedan retenidos en el *liner*y, una vez el disolvente es venteado, son focalizados en cabeza de columna. Como contrapartida, el PTV puede inducir fraccionamiento isotópico dependiente de la masa durante el proceso de evaporación del disolvente.

---

<sup>205</sup> Yang, L., Yu, B., Liu, H., Ji, X., Xiao, C., Liang, Y Hu, L., Yin, Y., Shi, J., Jiang, G. 2022. Online determination of mercury isotopic compositions at ultratrace levels by automated purge and trap coupled with multicollector inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 37(11), 2480-2489.

<sup>206</sup> Masbou, J., Point, D., Sonke, J. E. 2013. Application of a selective extraction method for methylmercury compound specific stable isotope analysis (MeHg-CSIA) in biological materials. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 28(10), 1620-1628.

<sup>207</sup> Janssen, S. E., Johnson, M. W., Blum, J. D., Barkay, T., Reinfelder, J. R. 2015. Separation of monomethylmercury from estuarine sediments for mercury isotope analysis. *Chemical geology*, 411, 19-25.

<sup>208</sup> Bouchet, S., Bérail, S., Amouroux, D. 2018. Hg compound-specific isotope analysis at ultratrace levels using an on line gas chromatographic preconcentration and separation strategy coupled to multicollector-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 90(13), 7809-7816.

Adicionalmente, la medida de la composición isotópica específica de las especies de Hg también puede verse afectada por cierto fraccionamiento isotópico inducido durante el proceso de preparación de las muestras o por el fenómeno de la discriminación de masas, que tiene lugar durante el análisis instrumental y que viene provocado por los efectos *nozzle* y espacio-carga en la interfase del inyector del espectrómetro de masas. Como consecuencia a todos estos fenómenos se producen desviaciones de las  $R_i$  reales de las muestras, por lo que es necesaria su corrección.<sup>193</sup>

Para corregir los efectos de la discriminación de masas se han propuesto dos tipos de procedimientos, tal y como se vio en el capítulo anterior, los cuales pueden combinarse: i) procedimientos de corrección externa y ii) procedimientos de corrección interna. Los procedimientos de corrección externa se basan en la medida de la composición isotópica de un estándar de referencia (NIST SRM-3133) y permiten el cálculo de los valores  $\delta$  específicos de las especies de Hg, aplicando generalmente la estrategia SSB.<sup>82</sup> La corrección interna se lleva normalmente a cabo mediante la medida simultánea de las  $R_i$  de la muestra y de un estándar de referencia añadido a la muestra previamente. En el caso concreto de la medida de las  $R_i$  específicas de las especies de Hg la corrección interna se realiza mediante la nebulización continua de una disolución de Tl, aunque esto únicamente permite corregir los efectos instrumentales de la discriminación de masas y no el fraccionamiento isotópico inducido en el inyector de cromatógrafo de gases o durante el proceso de preparación de muestra.

Como alternativa de corrección interna de la discriminación de masas, siempre que el elemento del que se quieren determinar las  $R_i$  posea cuatro o más isótopos, puede aplicarse el método del doble trazador o del doble *spike* (DS), que permite también corregir el fraccionamiento isotópico a lo largo de las etapas de preparación y de medida de las muestras. Con el fin utilizar este método, es necesario seleccionar correctamente los trazadores, determinar la composición

óptima del doble trazador y caracterizarlo, además de establecer la proporción en la que se debe mezclar con la muestra, para lo que resulta de mucha utilidad la herramienta desarrollada por Rudge *et al.*<sup>209</sup> Este método ya ha sido aplicado previamente para la determinación de la composición isotópica de HgT, utilizando un doble trazador compuesto de <sup>204</sup>Hg y <sup>196</sup>Hg.<sup>210</sup> No obstante, a pesar de estar compuesto por una de las mejores mezclas de isótopos de acuerdo con Rudge *et al.*<sup>209</sup>, debido a su mínimo error asociado, la elaboración de este doble trazador conlleva altos costes económicos. Además, no todas las configuraciones de copas Faraday de los equipos MC-ICP-MS permiten recoger este par de isótopos.

### D.4.2. Objetivos

En este cuarto capítulo se determinan las relaciones isotópicas de mercurio inorgánico por medio de GC-MC-ICP-MS utilizando un doble trazador de <sup>199</sup>Hg(II) y <sup>201</sup>Hg(II) para la corrección interna de la discriminación de masas. Este objetivo general se dividió en los siguientes objetivos parciales:

- Caracterización de la composición isotópica de una disolución compuesta de dos trazadores isotópicos enriquecidos (<sup>199</sup>Hg(II) y <sup>201</sup>Hg(II)) para la corrección interna del fraccionamiento isotópico del Hg(II).
- Análisis en diferentes sesiones de medida del estándar primario NIST SRM-3133 frente al NIST SRM-3133 mediante GC-MC-ICP-MS aplicando diferentes condiciones de inyección (*Hot Splitless*, *Cold Splitless* y PTV) y dos formas de corrección de la discriminación de masas (SSB+TI y SSB+DS).
- Análisis en diferentes sesiones de medida del estándar secundario NIST RM-8610 (UM Almadén) frente al NIST SRM-3133 mediante GC-MC-ICP-MS

---

<sup>209</sup> Rudge, J. F., Reynolds, B. C., Bourdon, B. 2009. The double spike toolbox. *Chemical Geology*, 265(3-4), 420-431.

<sup>210</sup> Mead, C., Johnson, T. M. 2010. Hg stable isotope analysis by the double-spike method. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 397, 1529-1538.

aplicando diferentes condiciones de inyección (*Hot Splitless*, *Cold Splitless* y PTV) y dos formas de corrección de la discriminación de masas (SSB+TI y SSB+DS).

- Evaluación de la exactitud y la precisión de los valores  $\delta$  específicos del Hg(II) obtenidos mediante GC-MC-ICP-MS aplicando las diferentes condiciones de inyección (*Hot Splitless*, *Cold Splitless* y PTV) para comparar las dos formas de corrección de la discriminación de masas (SSB+TI y SSB+DS).

### D.4.3. Experimental

#### D.4.3.1. Instrumentación

Se utilizó el mismo equipo MC-ICP-MS Thermo Neptune (Thermo Fisher Scientific Bremen, Alemania) descrito en el capítulo anterior, acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent 7890A (Agilent Technologies, Tokio, Japón). Los parámetros experimentales se encuentran recogidos en la **Tabla 6** y **Tabla 7**. La disposición experimental se encuentra resumida en la sección **C.1.3.2.**

En el puerto de inyección del cromatógrafo de gases se instalaron dos tipos de *liners*: *liner* de lana de vidrio (4 mm i.d., 6.47 mm o.d., 78.5 mm length, Agilent Technologies) y *liner* de vidrio (4mm i.d., 6.5 mm o.d., 78.5 mm length, Merck).

Se usaron también la balanza Mettler Toledo MS205DU y el pH-metro Basic 20 CRISON.

#### D.4.3.2. Materiales y reactivos

La mayor parte de los materiales y los reactivos utilizados en este capítulo son los mismos que los del capítulo anterior y están también recogidos en la sección **C.2.** del Experimental general.

Para el  $\delta$ -cero estándar se usó el NIST SRM-3133 y como estándar secundario se utilizó el NIST RM-8610 (UM-Almadén).

## Resultados

---

Cuando se aplicaron condiciones de plasma húmedo, la corrección interna de la discriminación de masas se realizó utilizando el estándar de TI adquirido de Absolute Standards Inc. (Hamden, CT, EE. UU.) diluido en 2% de HNO<sub>3</sub> *subboiling* en agua Milli-Q.

Para corregir internamente la discriminación de masas en condiciones de plasma seco, se utilizó una disolución de doble trazador, basada en una mezcla aproximadamente 1:1 de <sup>199</sup>Hg(II) y <sup>201</sup>Hg(II). Los trazadores isotópicamente enriquecidos de <sup>199</sup>Hg(II) y <sup>201</sup>Hg(II) se adquirieron en ISC-Science (Oviedo, España) y se eligieron para componer la disolución de doble trazador porque, en términos de precios asequibles, proporcionan los errores más bajos según Rudge *et al*<sup>209</sup>.

### D.4.3.3. Procedimientos

Tanto la preparación de las muestras, como la medida de las R<sub>i</sub> del Hg(II) por GC-MC-ICP-MS han sido detallados en las secciones **C.3.4.1** y **C.3.7.1.**, respectivamente.

Los dos procedimientos de preparación de los estándares fueron iguales, con la diferencia de que a los patrones que se midieron en condiciones de plasma seco se les añadió al principio la disolución de doble trazador para la corrección de la discriminación de masas por el método del DS.

Para la introducción de las muestras se aplicaron diferentes modos de inyección del GC (*Hot Splitless* a 250°C, *Hot Splitless* a 125°C, *Cold Splitless* y PTV) en el GC.

Las R<sub>i</sub> del Hg(II) se calcularon mediante el método LRS a partir de la pendiente de la regresión lineal entre dos señales isotópicas en un rango de 321 puntos de Hg (160 puntos de adquisición antes y después del máximo de pico). También se corrigió el desfase temporal entre las copas de Faraday. (secciones **C.3.7.4.** y **C.3.7.3.**, respectivamente).

La corrección interna de la discriminación de masas se realizó de dos maneras diferentes: (i) con talio en condiciones de plasma húmedo, siguiendo la ley de Russell (tal y como se explicó en el capítulo anterior, sección **D.3.3.3.**) y (ii) aplicando el método del DS, en condiciones de plasma seco.

El método de DS aplicado se basa en el uso de una disolución, caracterizada en términos de composición isotópica, compuesta por una mezcla de dos trazadores isotópicos enriquecidos de  $^{199}\text{Hg(II)}$  y  $^{201}\text{Hg(II)}$ . Las disoluciones de los trazadores enriquecidos se mezclaron en una proporción de aproximadamente 1:1, ya que, según Rudge *et al.*<sup>209</sup>, a esta proporción se obtiene el error estimado más bajo para este sistema de dos isótopos. Existen otras mezclas óptimas para la elaboración de la disolución del DS de Hg, con errores estimados menores, sin embargo, la mezcla propuesta en este capítulo es mucho más asequible económicamente. Las muestras y el DS se mezclaron en una proporción aproximada de 6:4, para obtener errores estimados en el rango de 0,0073 ppm/uma.<sup>209</sup>

En la **Tabla 31** se encuentra recogida la composición isotópica de la disolución del DS utilizada. Se ha de tener en cuenta que la especie química que compone el doble trazador debe ser la misma que la de la muestra cuya composición isotópica se quiere determinar, por lo que en nuestro caso se usó un doble trazador de Hg(II). Para la caracterización del trazador se aplicó el método del DS de manera inversa, utilizando los valores de la composición isotópica de referencia del patrón NIST SRM-3133 (NIMS).<sup>198</sup>

Tabla 31. Composición isotópica de la disolución del doble trazador.

Hg(II)	Disolución DS (%)
$^{198}\text{Hg}$	0,64
$^{199}\text{Hg}$	44,23
$^{200}\text{Hg}$	2,55
$^{201}\text{Hg}$	50,38
$^{202}\text{Hg}$	2,20

En la **Figura 56** se observa un diagrama de la técnica del DS, adaptado de Rudge *et al.*<sup>209</sup>

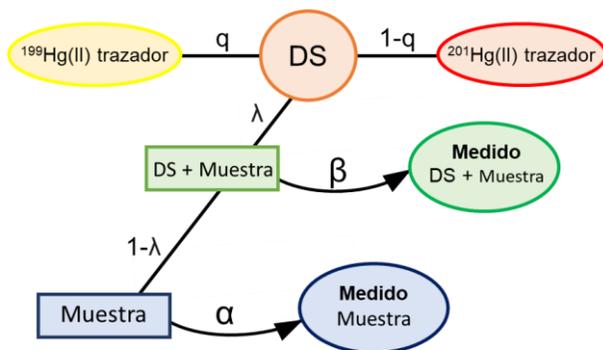


Figura 56. Diagrama de la técnica del DS, adaptado de Rudge *et al.*<sup>209</sup>

En este caso concreto, el sistema al que se aplica la metodología del DS no es radiogénico y solo se espera MDF en los procesos involucrados, por lo que no resulta necesario realizar una medida adicional de la muestra por separado. Si las relaciones isotópicas en la muestra sufriesen tanto MDF como MIF se debería realizar una medida adicional de la muestra. Los valores  $\alpha$  y  $\beta$  representan los factores de la discriminación de masas, y  $\lambda$  es el factor de la proporción entre el trazador del doble *spike* y la muestra en la mezcla. En este modelo se asume que la discriminación de masas sigue la ley exponencial, a pesar de que otros modelos

aplican la ley lineal<sup>211,212</sup> y de que también se evaluó la ley de Russell. La ecuación de la mezcla entre la disolución del DS y la muestra es la siguiente:

$$M_i = \lambda T_i + (1 - \lambda)N_i \quad (53)$$

donde  $M_i$ ,  $N_i$  y  $T_i$  son las relaciones isotópicas reales referidas al isótopo  $^{201}\text{Hg}$  de la mezcla, la muestra y el trazador, respectivamente. Se utilizó  $^{201}\text{Hg}$  como denominador común en los cálculos, sin embargo, los resultados son independientes de esta elección.

De acuerdo con la ley exponencial se pueden escribir las ecuaciones (54) y (55):

$$n_i = N_i e^{\alpha \log \left( \frac{w^{XXX}}{w^{201}} \right)} \quad (54)$$

$$m_i = M_i e^{\beta \log \left( \frac{w^{XXX}}{w^{201}} \right)} \quad (55)$$

donde  $n_i$  y  $m_i$  son las relaciones isotópicas medidas, referidas también al isótopo  $^{201}\text{Hg}$ , de la muestra y la mezcla, respectivamente, y  $\frac{w^{XXX}}{w^{201}}$  es la relación de las masas atómicas del isótopo correspondiente  $^{XXX}\text{Hg}$  y el isótopo  $^{201}\text{Hg}$ .

Si se combinan las ecuaciones (53), (54) y (55) se obtiene la ecuación:

$$F_i(\lambda, \alpha, \beta, n, m, T) = \lambda T_i + (1 - \lambda)n_i e^{-\alpha \log \frac{w^{XXX}}{w^{201}}} - m_i e^{-\beta \log \frac{w^{XXX}}{w^{201}}} = 0 \quad (56)$$

Dependiendo del número de relaciones isotópicas medidas ( $n_1, n_2, n_3, \dots, n_q$ ) tendremos una serie de  $q$  ecuaciones no lineales, que deben resolverse para

---

<sup>211</sup> Dodson, M. H. 1963. A theoretical study of the use of internal standards for precise isotopic analysis by the surface ionization technique: Part I-General first-order algebraic solutions. Journal of Scientific Instruments, 40(6), 289.

<sup>212</sup> Albarède, F., & Beard, B. 2004. Analytical methods for non-traditional isotopes. Reviews in mineralogy and geochemistry, 55(1), 113-152.

obtener los valores de  $\lambda$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ . Si los valores de  $\alpha$  y  $\beta$  son pequeños ( $\alpha, \beta \ll 1$ ) estas ecuaciones pueden linealizarse:

$$\lambda (T_i - n_i) - (1 - \lambda) \alpha n_i \log\left(\frac{W^{XXX}}{W^{201}}\right) - \beta m_i \log\left(\frac{W^{XXX}}{W^{201}}\right) = m_i - n_i \quad (57)$$

Este sistema de  $q$  ecuaciones y tres incógnitas ( $\lambda$ ,  $(1 - \lambda) \alpha$  y  $\beta$ ) se puede resolver mediante regresión lineal múltiple y los resultados se utilizan como punto de partida de los siguientes cálculos iterativos no lineales (ecuación (56)), necesarios para hallar las relaciones isotópicas de la muestra corregidas por la discriminación de masas. Estos cálculos se basan en un Jacobiano compuesto con las derivadas parciales de la ecuación (56) en su forma matricial. Las iteraciones se realizan con el *software* Excel y cuando los resultados convergen, se realiza la inversión para obtener la composición real de la muestra.

Para el cálculo de las incertidumbres se aplicó el método de Kragten<sup>63</sup>, combinando las incertidumbres de las relaciones isotópicas no corregidas obtenidas por medio de LRS. De acuerdo con el método de Kragten, se realizó una adición secuencial de las incertidumbres de cada parámetro y se calcularon las diversas relaciones isotópicas a partir de estos valores alterados. La incertidumbre final combinada se obtuvo a partir de la raíz cuadrada de la suma de las diferencias entre los valores alterados y los reales.<sup>54</sup>

Para el cálculo de los  $\delta$  específicos del Hg(II) se aplica el SSB tradicional.

### D.4.4. Resultados y discusión

#### D.4.4.1. Comparación de las condiciones de plasma húmedo y seco

Los patrones se inyectaron en condiciones de plasma húmedo, mediante la nebulización continua postcolumna de una disolución de TI, y en condiciones de plasma seco, introduciendo el tubo de salida de teflón del GC directamente en la

antorcha. La corrección de la discriminación de masas en condiciones de plasma húmedo se realizó de manera convencional aplicando la ley de Russell y el método SSB y en condiciones de plasma seco se combinó el método del DS con el método SSB. La disolución del DS se mezcló con los patrones para obtener una proporción de 6:4. Se probaron diferentes proporciones de mezcla entre los patrones y el DS y se seleccionó la que proporcionaba los valores de RSD% menores para las relaciones isotópicas calculadas frente al isótopo  $^{201}\text{Hg}$ , como puede observarse en la **Tabla 32**.

**Tabla 32.** Valores de RSD% de las relaciones isotópicas calculadas frente al isótopo  $^{201}\text{Hg}$  para diferentes mezclas entre el estándar NIST SRM-3133 y el doble trazador.

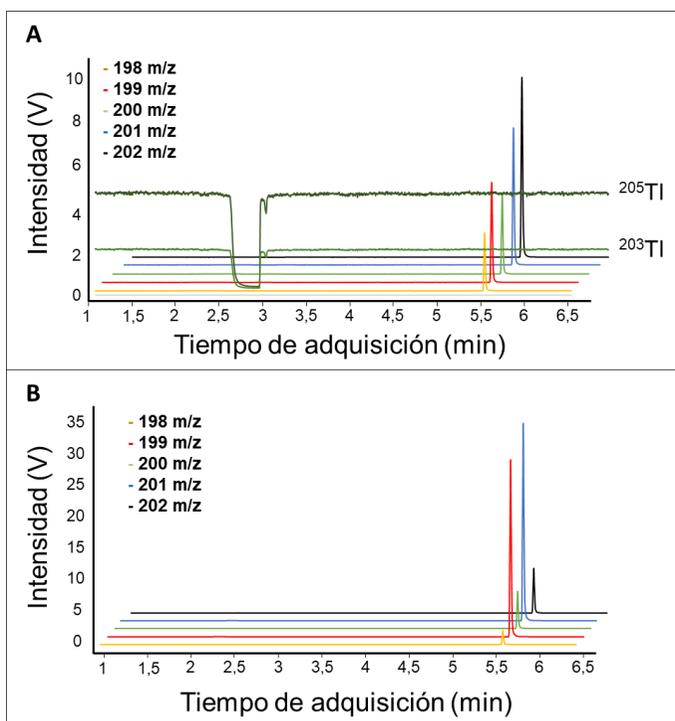
RSD%	NIST SRM 3133 2:1 DS	NIST SRM 3133 4:6 DS	NIST SRM 3133 1:1 DS	NIST SRM 3133 6:4 DS
$^{198}\text{Hg}/^{201}\text{Hg}$	0,13	0,09	0,10	0,11
$^{199}\text{Hg}/^{201}\text{Hg}$	0,07	0,05	0,06	0,07
$^{200}\text{Hg}/^{201}\text{Hg}$	0,04	0,03	0,03	0,04
$^{202}\text{Hg}/^{201}\text{Hg}$	0,04	0,03	0,03	0,04

Aplicando condiciones de plasma seco se consiguió un aumento significativo de la sensibilidad, como puede observarse en la **Figura 57**, donde se muestran dos cromatogramas adquiridos en condiciones de plasma húmedo (**A**) y condiciones de plasma seco (**B**).

En ambos casos se inyectaron 2  $\mu\text{L}$  del estándar NIST SRM-3133 en el cromatógrafo de gases mediante el modo de inyección *Hot Splitless* a 125°C. En condiciones de plasma húmedo la concentración del patrón de abundancia isotópica natural fue de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , mientras que en condiciones de plasma seco fue de 400  $\mu\text{g L}^{-1}$ . El máximo de pico en condiciones de plasma húmedo se obtuvo en 8V para el isótopo  $^{202}\text{Hg}$  y en condiciones de plasma seco en 5V, por lo que se establece una ganancia en la sensibilidad de aproximadamente 1,5 en condiciones de plasma seco, lo que coincide con otros resultados, como se verá

## Resultados

en el **Capítulo V**. Esto se atribuye a una mayor tasa de flujo de gas portador, que además no se mezcla con el gas adicional que porta el TI en condiciones de plasma húmedo, evitándose así inestabilidades en el plasma. Como desventaja, a lo largo de la sesión de medida en condiciones de plasma seco, la sensibilidad disminuye progresivamente debido a la formación de depósitos de carbonilla a la entrada del cono de muestreo o *sampler*.



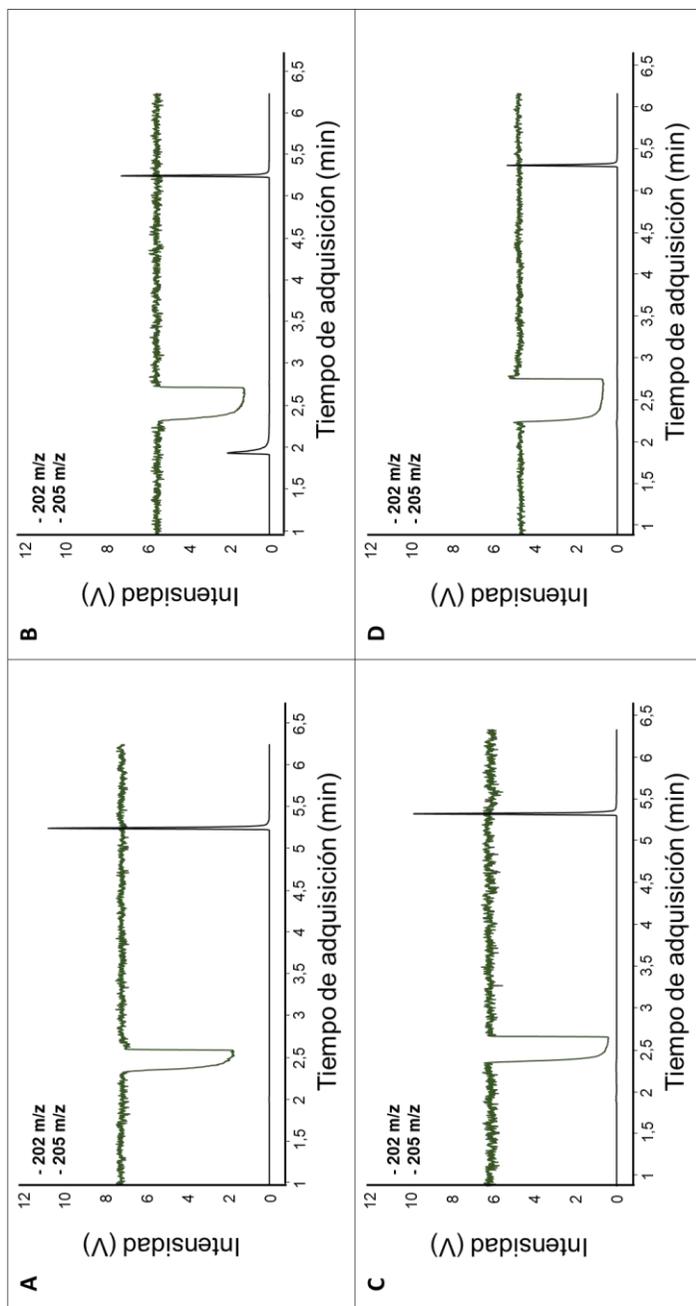
**Figura 57.** Cromatogramas obtenidos inyectando 2  $\mu\text{L}$  del estándar NIST SRM-3133 en el cromatógrafo de gases mediante el modo de inyección *Hot Splitless* a 125°C. (A) Condiciones de plasma húmedo ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  NIST SRM-3133). (B) Condiciones de plasma seco ( $400 \mu\text{g L}^{-1}$  NIST SRM-3133 + DS).

### D.4.4.2. Comparación de los modos de inyección del GC

Se aplicaron tres modos de inyección diferentes (*Hot Splitless*, *Cold Splitless* y PTV). El modo de inyección *Hot Splitless* se aplicó a dos temperaturas diferentes (125°C y 250°C). Para los modos de inyección *Hot Splitless* y *Cold Splitless* se inyectaron entre 1 y 3  $\mu\text{L}$  de muestra, en función de las condiciones diarias de

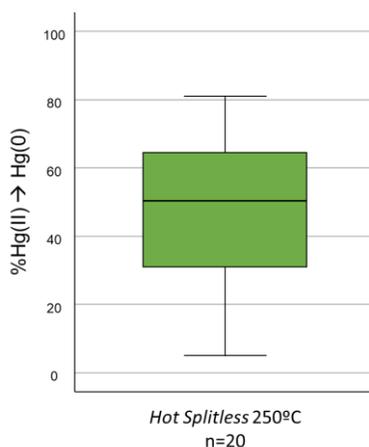
sensibilidad del equipo, tanto para los patrones que se midieron en condiciones de plasma húmedo, como los que se midieron en condiciones de plasma seco mezclados con la disolución del DS. En el modo de inyección PTV se inyectaron entre 10 y 20  $\mu\text{L}$ , también en función de las condiciones de sensibilidad diarias.

Una de las principales diferencias entre los modos de inyección *Hot Splitless* y *Cold Splitless* con el modo PTV puede apreciarse directamente al observar la señal constante de TI de los cromatogramas de la **Figura 58** obtenidos para el NIST RM-8610. La distorsión del TI que se observa a los dos minutos y medio se atribuye a la entrada del disolvente en el MC-ICP-MS. Entre los modos de inyección *Hot Splitless* a 125°C y *Cold Splitless* (cromatogramas **A** y **C**, respectivamente) no se aprecian apenas diferencias en la anchura de la distorsión de TI, ya que en ambos casos todo el disolvente es introducido en el espectrómetro de masas. En el cromatograma **B** de la **Figura 58** (*Hot Splitless* a 250°C) puede verse como la distorsión es más ancha, pues en este caso concreto se inyectaron 3  $\mu\text{L}$  de disolución y no 2  $\mu\text{L}$ , como en los dos modos mencionados previamente (*Hot Splitless* a 125°C y *Cold Splitless*). No obstante, la mayor distorsión se observa en el modo PTV (cromatograma **D** de la **Figura 58**), ya que a pesar de que gran parte del disolvente es venteado, otra gran cantidad es introducido en el MC-ICP-MS.



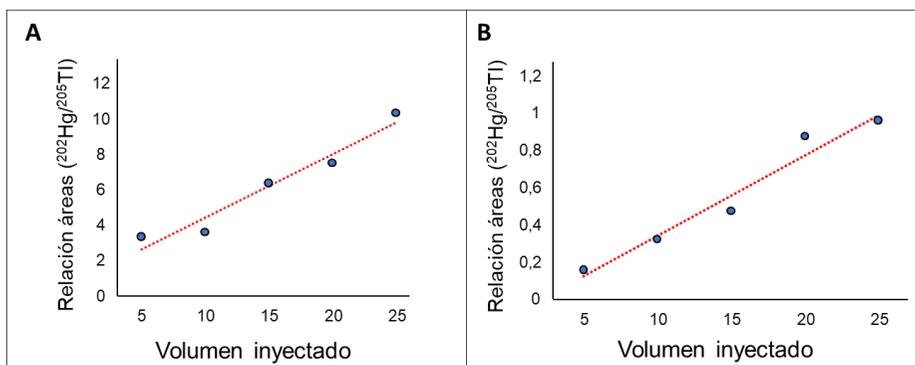
**Figura 58.** Cromatogramas obtenidos inyectando el estándar NIST RM-8610 (UM Almadén) en el cromatógrafo de gases mediante los diferentes modos de inyección en condiciones de plasma húmedo. (A) *Hot Splitless* a 125°C (2  $\mu\text{L}$  de una disolución de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NIST RM-8610). (B) *Hot Splitless* a 250°C (3  $\mu\text{L}$  de una disolución de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NIST RM-8610). (C) *Cold Splitless* (2  $\mu\text{L}$  de una disolución de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NIST RM-8610). (D) PTV (20  $\mu\text{L}$  de una disolución de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  de NIST RM-8610).

Cuando se utiliza el modo de inyección *Hot Splitless* a 250°C se produce una reducción del Hg(II) a Hg(0), como puede observarse en el cromatograma **B** de la **Figura 58**. Esta reducción se atribuye a la presencia de una pieza de oro en el inyector y no se mantiene constante entre inyecciones, pudiendo variar entre el 5 y el 80%, como se observa en el diagrama de la **Figura 59**, donde se representa el porcentaje de Hg(0) formado en 20 inyecciones de entre 2-3 µL en el modo *Hot Splitless* a 250°C.



**Figura 59.** % de Hg(0) formado a partir del Hg(II) en n=20 inyecciones de entre 2-3 µL en el modo *Hot Splitless* a 250°C. Los percentiles 25, 50 y 75 están representados por recuadros y los valores máximo y mínimo por bigotes.

Se estudió el rango lineal del inyector en el modo PTV, por medio de la inyección de volúmenes crecientes del estándar NIST SRM-3133 a dos concentraciones distintas (600 y 60 µg L<sup>-1</sup>). En las gráficas de la **Figura 60**, donde se representa la relación de áreas entre el <sup>202</sup>Hg y el <sup>205</sup>Tl frente al volumen de inyección, se puede observar que para ambas concentraciones el inyector ofrece una respuesta lineal entre los 5 y los 25 µL de volumen inyectados. Cuando se aplica el modo de inyección PTV, la sensibilidad aumenta en un factor de 5 en comparación con los otros dos modos de inyección.



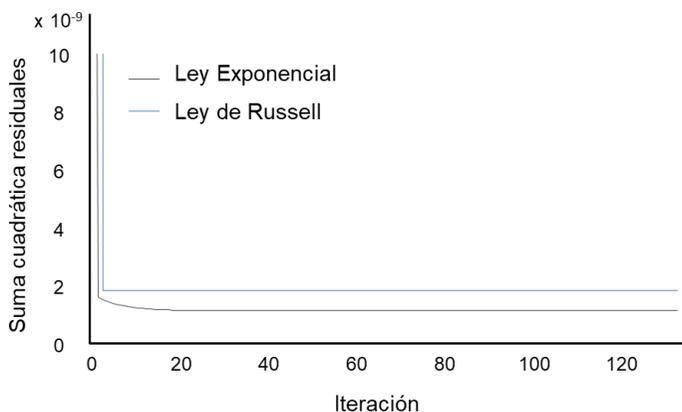
**Figura 60.** Relación de áreas  $^{202}\text{Hg}/^{205}\text{Tl}$  frente al volumen inyectado del estándar NIST SRM-3133 en el modo PTV. (A)  $600\ \mu\text{g L}^{-1}$  y (B)  $60\ \mu\text{g L}^{-1}$ .

### D.4.4.3. Evaluación de los modos de corrección sin fraccionamiento isotópico en el inyector

Para la evaluación de los dos modos de corrección de la discriminación de masas (corrección interna con TI y SSB y corrección interna por el método del DS y SSB) sin fraccionamiento isotópico inducido en el inyector se evaluaron los valores  $\delta$  específicos del Hg(II) del NIST SRM-3133 y del NIST RM-8610 (UM-Almadén), obtenidos inyectando en el GC en el modo *Hot Splitless* a  $125^\circ\text{C}$ . Teóricamente, este modo de inyección no genera fraccionamiento isotópico adicional en el inyector, ya que no se produce purga del disolvente, por lo que no debería producirse pérdida de Hg(II) durante el proceso de inyección.

La corrección interna de la discriminación de masas con el método del DS se realizó aplicando la ley exponencial, aunque se evaluó también la ley de Russell, como puede observarse en el gráfico de la **Figura 61**, donde se representa la suma cuadrática de los residuales de la diferencia  $m_i - n_i$  para cada una de las iteraciones. Como puede apreciarse, esta suma cuadrática de los residuales es menor aplicando la ley exponencial, por lo que se ajustaría mejor al método del DS. Tanto aplicando la ley de Russell, como aplicando la ley exponencial, la suma cuadrática de los residuales es mínima en torno a la iteración número 20, sin

embargo, al modelo se le añadieron 135 iteraciones para asegurar la convergencia de los resultados.

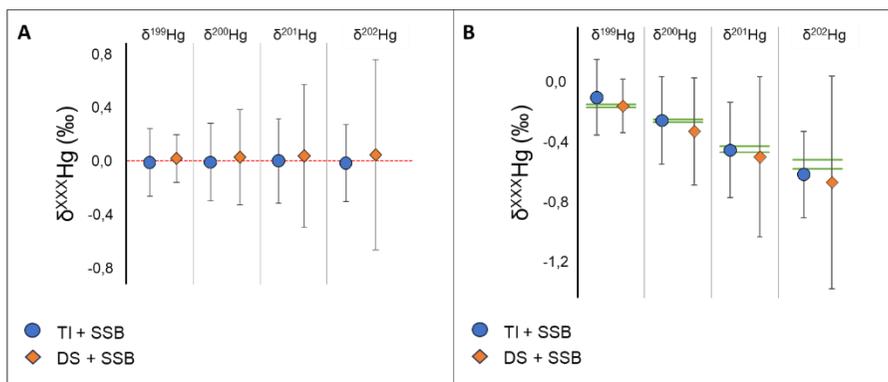


**Figura 61.** Suma cuadrática de los residuales de la diferencia  $m_i - n_i$  para cada iteración aplicando las leyes exponencial y de Russell al método del DS.

En la **Figura 62** se muestran los valores  $\delta$  específicos del Hg(II) ( $n=10$ ) corregidos por el método clásico, combinando la corrección interna con TI y SSB, y por el método del DS y SSB de cuatro sesiones de medida diferentes, utilizando el inyector en el modo *Hot Splitless* a 125°C. En el gráfico **A** de la **Figura 62** se representan los valores de dos sesiones de medida del  $\delta$ -cero estándar, obtenidos mediante la medida del NIST SRM-3133 frente al NIST SRM-3133, mientras que en el gráfico **B** se representan los valores de dos sesiones de medida del estándar secundario NIST RM-8610 (UM-Almadén) medido frente al NIST SRM-3133. La línea roja punteada del gráfico **A** representa el valor  $\delta$ -cero estándar y las líneas verdes del gráfico **B** representan el  $\pm 2SD$  de los valores certificados del NIST RM-8610; las barras de error representan los valores 2SD de  $n=10$  medidas. Los valores 2SD de los  $\delta$  específicos del Hg(II) del NIST SRM-3133 corregidos internamente con TI y SSB varían entre 0,25 y 0,32 y entre 0,18 y 0,71 para los valores 2SD de los  $\delta$  específicos corregidos por el método del DS y SSB. En ambos casos, los valores medios de los  $\delta$  específicos son cercanos a cero. En el caso del estándar secundario NIST RM-8610 (UM-Almadén), los valores 2SD

## Resultados

asociados a todos los  $\delta$  son también menores para las condiciones de plasma húmedo (corregidos internamente con TI y SSB), variando entre 0,19 y 0,27, en comparación con los obtenidos en condiciones de plasma seco (corrección interna por el método del DS y SSB), que varían entre 0,13 y 0,51.



**Figura 62.** Valores  $\delta$  específicos del Hg(II) (n=10) corregidos por TI + SSB y DS + SSB de cuatro sesiones de medida diferentes utilizando el inyector en el modo *Hot Splitless* a 125°C. (A) Dos sesiones de medida NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133. La línea roja punteada representa el valor  $\delta$ -cero estándar. (B) Dos sesiones de medida NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133. Las barras de error representan 2SD de n=10 medidas. Las líneas verdes representan  $\pm 2\text{SD}$  de los valores certificados del NIST RM-8610.

En términos generales, se podría decir que el método del DS combinado con SSB es ligeramente peor que el método tradicional de corrección de la discriminación de masas con TI y SSB cuando no hay fraccionamiento isotópico inducido en el inyector. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que la concentración de los estándares inyectados en condiciones de plasma húmedo (corrigiendo internamente la discriminación de masas con TI) fue siempre de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  frente a 400  $\mu\text{g L}^{-1}$  en condiciones de plasma seco (corrigiendo internamente la discriminación de masas con el método del DS).

### D.4.4.4. Evaluación de los modos de corrección con fraccionamiento isotópico en el inyector

Se asume que tanto el modo de inyección PTV, como el modo *Hot Splitless* a 250°C, generan fraccionamiento isotópico en el inyector, debido al proceso de

evaporación del disolvente y a la reducción del Hg(II) a Hg(0), respectivamente. Para evaluar los modos de corrección de la discriminación de masas (TI+SSB y DS+SSB) con fraccionamiento isotópico en el inyector, se estudiaron los valores  $\delta$  específicos del Hg(II) del estándar primario NIST SRM-3133 y del estándar secundario NIST RM-8610, obtenidos utilizando los modos de inyección *Hot Splitless* a 250°C y PTV.

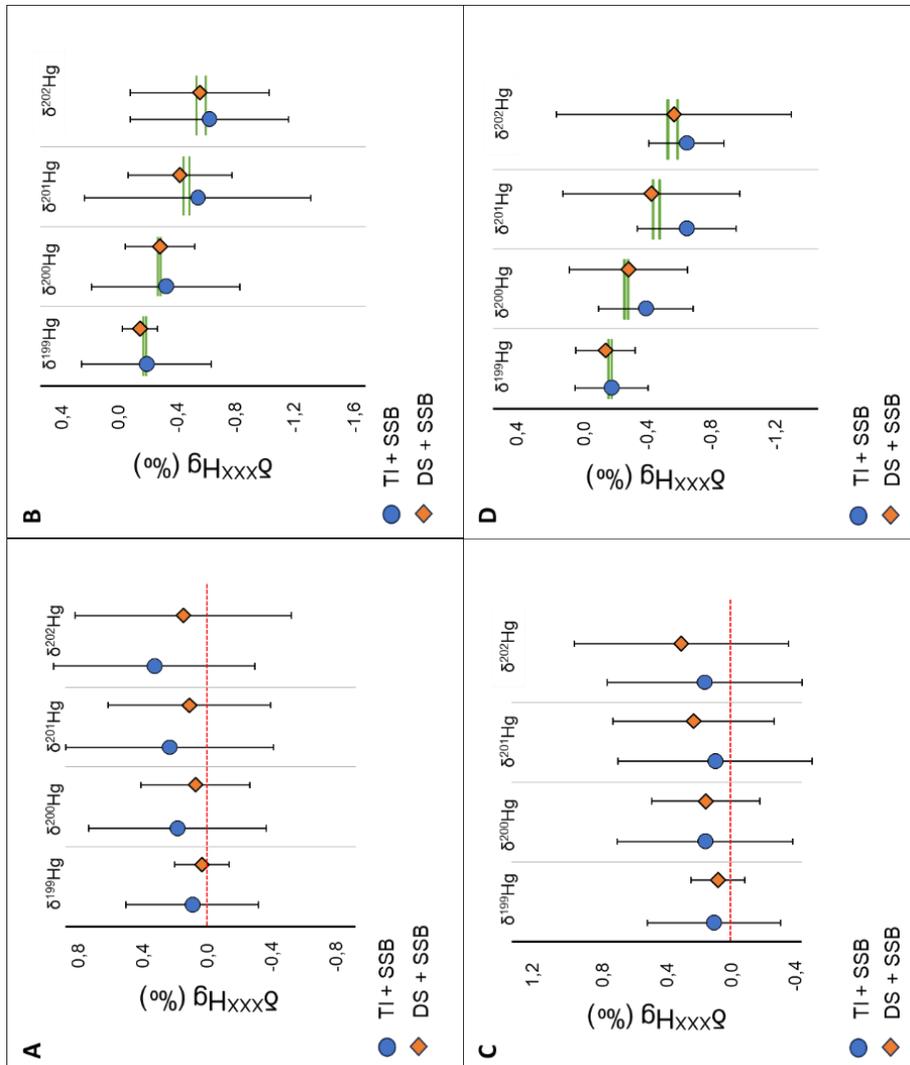
En la **Figura 63** se representan los valores  $\delta$  específicos del Hg(II) (n=10) corregidos por el método clásico (TI+SSB) y combinando el método del DS con SSB, utilizando el inyector en los modos *Hot Splitless* y PTV. La línea roja punteada representa el valor  $\delta$ -cero estándar y las líneas verdes representan el  $\pm 2SD$  de los valores certificados del NIST RM-8610; las barras de error representan los valores 2SD de n=10 medidas.

En los gráficos **A** y **B** de la **Figura 63** se representan los valores  $\delta$  específicos del Hg(II) de cuatro sesiones de medida inyectando en el modo *Hot Splitless* a 250°C (el *bracketing* se realizó inyectando en el modo *Hot Splitless* a 125°C para evitar la reducción del patrón): dos sesiones de medida del  $\delta$ -cero estándar (NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133) (**A**) y dos sesiones de medida del estándar secundario NIST RM-8610 (UM-Almadén) (NIST RM 8610 vs. NIST SRM-3133) (**B**). Los valores 2SD de los  $\delta$  específicos del NIST SRM-3133 corregidos por TI y SSB variaron entre 0,36 y 0,55 y entre 0,15 y 0,60 para los corregidos por DS y SSB. En general, los valores 2SD fueron menores para todos los  $\delta$  específicos del NIST SRM-3133 corregidos por DS y SSB, exceptuando el valor asociado al  $\delta$  <sup>202</sup>Hg, como se puede observar en el gráfico **A** de la **Figura 63**. Los valores medios de los  $\delta$  específicos de Hg(II) son cercanos a cero utilizando ambos tipos de corrección. Los valores 2SD asociados a los  $\delta$  específicos del NIST RM-8610 son también menores cuando se aplica el método del DS combinado con SSB (0.12-0.48) en comparación con los corregidos por TI y SSB (0,45-0,78). En ambos casos,

los valores medios coinciden con los valores certificados del NIST RM-8610 (UM-Almadén), como se observa en el gráfico **B** de la **Figura 63**.

En los gráficos **C** y **D** de la **Figura 63** se representan los valores  $\delta$  específicos del Hg(II) de cuatro sesiones de medida inyectando en el modo PTV: dos sesiones de medida del  $\delta$ -cero estándar (NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133) (**C**) y dos sesiones de medida del estándar secundario NIST RM-8610 (UM-Almadén) (NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133) (**D**). Los valores 2SD asociados a los  $\delta$  específicos del NIST SRM-3133 corregidos por TI y SSB variaron entre 0,41 y 0,60, mientras que los corregidos por el método del DS y SSB variaron entre 0,17 y 0,67. Al igual que para los valores de  $\delta$ -cero estándar obtenidos inyectando en el modo *Hot Splitless* a 250°C, todos los valores 2SD asociados a los  $\delta$  específicos del NIST SRM-3133 fueron menores aplicando el método del DS y SSB, exceptuando el valor 2SD asociado al  $\delta^{202}\text{Hg}$ , como puede observarse en el gráfico **C** de la **Figura 63**. Los valores medios de los  $\delta$  específicos del NIST SRM-3133 fueron menores al aplicar el método clásico de corrección (TI+SSB), Los valores 2SD asociados a los  $\delta$  específicos del NIST RM-8610 corregidos por TI y SSB variaron entre 0.23 y 0.31 y entre 0.18 y 0.73 para los corregidos por DS y SSB, aunque como puede observarse en el gráfico **D** de la **Figura 63**, en general son más exactos para el segundo de los casos de corrección (DS+SSB).

Varios valores 2SD asociados a los  $\delta$  específicos del Hg(II), tanto del NIST SRM-3133, como del NIST RM-8610, resultaron ser superiores a 0,50 ‰ (valor de reproducibilidad aceptado para señales transientes obtenidas por GC-MC-ICP-MS), si bien se ha de tener en cuenta que en este experimento se forzaron condiciones extremas de fraccionamiento isotópico en el inyector. En general, el método del DS en combinación con SSB resultó ser algo mejor para la corrección de la discriminación de masas con fraccionamiento isotópico inducido en el inyector que el método clásico combinando la corrección interna con TI y SSB.



**Figura 63.** Valores  $\delta$  específicos del Hg(II) ( $n=10$ ) corregidos por TI + SSB y DS + SSB de ocho sesiones de medida diferentes utilizando el inyector en los modos *Hot Splitless* a 250°C y PTV. (A) Dos sesiones de medida NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133. (*Hot Splitless* a 250°C) (B) Dos sesiones de medida NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133. (*Hot Splitless* a 250°C). (C) Dos sesiones de medida NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133. (PTV) (D) Dos sesiones de medida NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133. Las líneas verdes representan  $\pm 2\text{SD}$  de los valores certificados del NIST RM-8610. (PTV). La línea roja punteada representa el valor  $\delta$ -cero estándar. Las líneas verdes representan  $\pm 2\text{SD}$  de los valores certificados del NIST RM-8610. Las barras de error representan 2SD de  $n=10$  medidas.

También se evaluó la mejor opción de *bracketing* para aplicar la corrección externa de la discriminación de masas cuando se induce fraccionamiento

## Resultados

---

isotópico en el inyector debido a la purga de disolvente. Se estudiaron los valores  $\delta$  específicos del Hg(II) obtenidos inyectando en el modo PTV, aplicando dos posibles *bracketing*, ya que el fundamento de este modo de inyección es el mismo que el del modo *Cold Splitless*: *bracketing* PTV-PTV y *bracketing Cold Splitless*-PTV. En la **Tabla 33** se recogen los valores  $\delta$  específicos ( $n=10$ ) de ocho sesiones de medida independientes, cuatro sesiones de medida del  $\delta$ -cero estándar (NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133) y cuatro sesiones de medida del estándar secundario UM-Almadén (NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133), aplicando las dos correcciones internas de la discriminación de masas (TI y DS) y realizando los dos posibles *bracketing* (PTV-PTV y *Cold Splitless*-PTV).

**Tabla 33.** Valores  $\delta$  específicos del Hg(II) (n=10) de ocho sesiones de medida independientes con fraccionamiento isotópico en el inyector, aplicando dos correcciones de discriminación de masas internas (TI y DS) y dos posibles *bracketing* para la corrección externa de la discriminación de masas (PTV-PTV y *Cold Splitless*-PTV) para el NIST SRM-3133 y el NIST RM-8610.

		$\delta^{199}\text{Hg}$	$\delta^{200}\text{Hg}$	$\delta^{201}\text{Hg}$	$\delta^{202}\text{Hg}$
Corrección interna	SSB	NIST SRM-3133			
Talio	PTV-PTV	0,10 ± 0,41	0,16 ± 0,55	0,10 ± 0,60	0,16 ± 0,60
Talio	<i>Cold Splitless</i> -PTV	-0,08 ± 0,49	-0,08 ± 0,51	-0,10 ± 0,39	-0,10 ± 0,49
DS	PTV-PTV	0,08 ± 0,17	0,15 ± 0,33	0,23 ± 0,50	0,31 ± 0,67
DS	<i>Cold Splitless</i> -PTV	0,03 ± 0,14	0,05 ± 0,28	0,08 ± 0,42	0,11 ± 0,55
Corrección interna	SSB	NIST RM-8610			
	REFERENCIA	-0,17 ± 0,01	-0,27 ± 0,01	-0,46 ± 0,02	-0,56 ± 0,03
Talio	PTV-PTV	-0,18 ± 0,23	-0,39 ± 0,29	-0,65 ± 0,31	-0,65 ± 0,23
Talio	<i>Cold Splitless</i> -PTV	-0,25 ± 0,53	-0,45 ± 0,53	-0,61 ± 0,91	-0,82 ± 0,86
DS	PTV-PTV	-0,14 ± 0,18	-0,28 ± 0,37	-0,43 ± 0,55	-0,57 ± 0,73
DS	<i>Cold Splitless</i> -PTV	-0,09 ± 0,18	-0,18 ± 0,36	-0,27 ± 0,53	-0,35 ± 0,71

En general, los valores 2SD fueron menores cuando se realizó el *bracketing Cold Splitless*-PTV, lo que se explicaría por la ausencia de fraccionamiento isotópico inducido en el inyector en el modo *Cold Splitless*. Los valores medios  $\delta$ -cero fueron menores también para el *bracketing Cold Splitless*-PTV. Sin embargo, los valores medios de los  $\delta$  específicos para el NIST RM-8610 fueron en general más exactos cuando se aplicó el *bracketing* PTV-PTV.

### D.4.5. Conclusiones

En este cuarto capítulo se elabora un método para la determinación de las R<sub>i</sub> de Hg(II) por medio de GC-MC-ICP-MS utilizando un doble trazador de <sup>199</sup>Hg(II) y <sup>201</sup>Hg(II) para la corrección interna de la discriminación de masas y SSB para la corrección externa y se compara con el método de clásico corrección de la discriminación de masas (TI+SSB).

Se elaboró y se caracterizó un el doble trazador de Hg(II), que se mezcló con los patrones naturales (NIST SRM-3133 y NIST RM-8610) en una proporción de 6:4. Se compararon las condiciones de plasma húmedo, obtenidas mediante la nebulización continua de TI postcolumna para la corrección interna de la discriminación de masas, y las condiciones de plasma seco, para las que la corrección interna de la discriminación de masas se realizó con el DS. Las condiciones de plasma seco aportaron una sensibilidad 1,5 veces mayor que las condiciones de plasma húmedo.

Se aplicaron diferentes modos de inyección en el inyector del GC (*Hot Splitless*, *Cold Splitless* y PTV). El modo de inyección PTV resultó ser cinco veces más sensible, asumiéndose que induce cierto fraccionamiento isotópico debido a la evaporación del disolvente. Se asumió también la inducción de fraccionamiento isotópico en el inyector al utilizar el modo *Hot Splitless* a 250°C, debido a la reducción de Hg(II) a Hg(0).

En ausencia de fraccionamiento isotópico en el inyector (aplicando el modo de inyección *Hot Splitless* a 125°C) el método clásico de corrección de la discriminación de masas (TI+SSB) resultó ser ligeramente mejor que el método del DS combinado con SSB, aunque se ha de tener en cuenta que la concentración de los patrones en condiciones de plasma húmedo fue de más del doble que en condiciones de plasma seco. Con presencia de fraccionamiento isotópico inducido en el inyector, el método del DS combinado con SSB resultó ser, en

general, algo mejor que el método clásico (TI+SSB). Para la corrección externa de la discriminación de masas con fraccionamiento isotópico inducido en el inyector debido a la evaporación del disolvente la mejor de las posibilidades fue el *bracketing Cold Splitless-PTV*.

El método del DS elaborado podría aplicarse para la corrección interna de la discriminación de masas de muestras reales de baja concentración de Hg para la determinación de la composición isotópica específica del Hg(II).



## **D.5. CAPÍTULO V**

**Ampliación del rango de aplicación del análisis isotópico de Hg utilizando CVG-MC-ICP-MS hasta concentraciones sub- $\mu\text{g L}^{-1}$  mediante amplificadores de copas Faraday de  $10^{13}$  ohmios**



### D.5.1. Introducción

Como se comentó en los capítulos previos, el Hg es un metal tóxico que se encuentra distribuido globalmente debido, a procesos naturales y ,especialmente, a actividades antropogénicas.<sup>213</sup> El mercurio elemental puede persistir en la atmósfera por más de medio año, pudiendo así viajar largas distancias y depositarse lejos de sus orígenes.<sup>134</sup> El Hg posee siete isótopos estables (<sup>196</sup>Hg (0,15%), <sup>198</sup>Hg (9,97%), <sup>199</sup>Hg (16,87%), <sup>200</sup>Hg (23,10%), <sup>201</sup>Hg (13,18%), <sup>202</sup>Hg (29,86%) y <sup>204</sup>Hg (6,87%)) los cuales, por medio de procesos químicos, biológicos y físicos, pueden experimentar fraccionamiento isotópico natural, que da lugar a pequeñas variaciones en su composición isotópica.

El mercurio es uno de los pocos elementos afectados por dos tipos de fraccionamiento isotópico, MDF y MIF.<sup>39</sup> Como se vio varias veces a lo largo del manuscrito, los valores de MDF y MIF se reportan siguiendo las recomendaciones de Blum y Bergquist, utilizando la notación delta ( $\delta^{xxx}\text{Hg}$  en ‰) y delta mayúscula ( $\Delta^{xxx}\text{Hg}$  en ‰), empleando como estándar  $\delta$ -cero el material de referencia NIST SRM-3133.<sup>64</sup> La combinación de MDF y MIF de los diferentes isótopos de Hg proporciona información valiosa para identificar fuentes de contaminación por Hg y para desentrañar las vías biogeoquímicas del Hg en los distintos compartimentos ambientales.<sup>214</sup>

Tradicionalmente, el análisis de la composición isotópica de Hg se realiza mediante MC-ICP-MS, utilizando CVG para la introducción de la muestra.<sup>95</sup> CVG proporciona una muy alta eficiencia en la introducción del analito, debido a la reacción específica entre el Hg(II) y el SnCl<sub>2</sub>, lo que teóricamente permite una

---

<sup>213</sup> Fitzgerald, W. F., Clarkson, T. W., 1991. Mercury and monomethylmercury: present and future concerns. *Environmental health perspectives*, 96, 159-166.

<sup>214</sup> Hintelmann, H., Bank, M. S., 2012. Use of stable isotopes in mercury research. *Mercury in the environment: Pattern and process*, 55-72.

eficiencia de introducción del analito del 100% a la fuente de ionización.<sup>215</sup> Además, CVG permite evitar el aislamiento cromatográfico tradicional del elemento objeto de estudio antes del análisis de su composición isotópica, ya que dicha separación del Hg de la matriz correspondiente se realiza *insitu* en la unidad de vapor frío. En general, estudios previos sobre la composición isotópica de Hg se limitaron a muestras con una concentración de Hg superior a  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  debido a la baja precisión asociada a las concentraciones más bajas de analito.

CVG-MC-ICP-MS permite un análisis isotópico de Hg exacto y preciso a niveles de concentración de hasta  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ , sin embargo, el análisis de muestras con niveles de concentración de Hg más bajos sigue siendo una tarea desafiante. Para superar estos obstáculos, algunos estudios han empleado estrategias de preconcentración utilizando técnicas cromatográficas<sup>208,216</sup>, trampas de oro<sup>205</sup> o de carbón activo<sup>217</sup>. No obstante, estos procedimientos de preparación de muestra hacen que el análisis isotópico de Hg sea laborioso y el riesgo de un posible fraccionamiento isotópico inducido durante el procedimiento de preparación de muestra. Como alternativa, la unidad CVG puede ser modificada eliminando el filtro de teflón ubicado en el medio de la cámara de la unidad y extendiendo el tubo que porta el gas adicional a dicha cámara. Esto permite evitar las altas presiones que se forman en la cámara y que provocan fluctuaciones en las señales

---

<sup>215</sup> Shi, M., Bergquist, B. A., Zhou, A., Zhao, Y., Sun, R., Chen, J., Zheng, W., 2023. The efficiency of Hg cold vapor generation and its influence on Hg isotope analysis by MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 38(5), 1076-1087.

<sup>216</sup> Chen, J., Hintelmann, H., Dimock, B., 2010. Chromatographic pre-concentration of Hg from dilute aqueous solutions for isotopic measurement by MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 25(9), 1402-1409.

<sup>217</sup> Li, K., Lin, C. J., Yuan, W., Sun, G., Fu, X., Feng, X., 2019. An improved method for recovering and preconcentrating mercury in natural water samples for stable isotope analysis. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(11), 2303-2313.

de Hg, logrando una mayor sensibilidad y, por lo tanto, permitiendo el análisis de muestras a un nivel de concentración de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg.<sup>218</sup>

Recientes avances instrumentales han conseguido mejorar la sensibilidad de los análisis por MC-ICP-MS. En primer lugar, se ha mejorado la eficiencia de la transmisión de iones mediante la mejora en la eficacia de la extracción de iones, que se ve influenciada por los voltajes de extracción y de aceleración y las geometrías de los conos de *sampler* y *skimmer*. Por ejemplo, Thermo Scientific equipó sus instrumentos MC-ICP-MS con la denominada "interfase *Jet*", que utiliza una bomba de alto rendimiento para mejorar el vacío de la interfase, y unos conos *sampler* y *skimmer* modificados geométricamente (*Jet sampler* y *skimmer* tipo X).<sup>100</sup> En segundo lugar, la precisión y exactitud de las relaciones isotópicas pueden verse comprometidas por haces de iones de baja intensidad, ya que la relación señal-ruido se ve afectada por el ruido electrónico de la línea de base, procedente de la resistencia del bucle de alimentación del amplificador.<sup>219</sup> Previamente, para detectar haces de iones de baja intensidad, se preferían los multiplicadores secundarios de electrones (SEM) en modo de recuento de iones sobre los detectores de copa Faraday, ya que los SEM no se ven afectados por problemas de ruido. Sin embargo, los detectores SEM sufren de variabilidad en la eficiencia de detección y en la intensidad del haz con el tiempo,<sup>219</sup> por lo que también es necesaria la corrección del tiempo muerto del detector, siendo una fuente adicional de incertidumbre<sup>220,221</sup>. Si bien, más recientemente, la

<sup>218</sup> Geng, H., Yin, R., Li, X., 2018. An optimized protocol for high precision measurement of Hg isotopic compositions in samples with low concentrations of Hg using MC-ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 33(11), 1932-1940.

<sup>219</sup> Koornneef, J. M., Bouman, C., Schwieters, J. B., Davies, G. R., 2014. Measurement of small ion beams by thermal ionisation mass spectrometry using new  $1013\Omega$  resistors. *Analytica Chimica Acta*, 819, 49-55.

<sup>220</sup> Nelms, S. M., Quérel, C. R., Prohaska, T., Vogl, J., Taylor, P. D., 2001. Evaluation of detector dead time calculation models for ICP-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16(4), 333-338.

<sup>221</sup> Vanhaecke, F., De Wannemacker, G., Moens, L., Dams, R., Latkoczy, C., Prohaska, T., Stingeder, G., 1998. Dependence of detector dead time on analyte mass number in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 13(6), 567-571.

incorporación de un amplificador de copa de Faraday de  $10^{13} \Omega$  sustituyendo al clásico de  $10^{11} \Omega$  resulta, teóricamente, en un aumento de 100 veces en el voltaje de salida y sólo de 10 veces en el ruido, mejorando la relación señal-ruido en un orden de magnitud, o un factor documentado experimentalmente de entre 5 y 10.<sup>101,222</sup>

Hasta donde sabemos, la combinación de una interfase *Jet* y de los amplificadores de  $10^{13} \Omega$  no se ha evaluado previamente para la medida de relaciones isotópicas de Hg en muestras con concentraciones bajas de Hg ( $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

### D.5.2. Objetivos

En este quinto capítulo se amplió el rango de aplicación del análisis isotópico de Hg utilizando CVG-MC-ICP-MS hasta concentraciones por debajo del  $\mu\text{g L}^{-1}$  mediante el uso de amplificadores de copas Faraday de  $10^{13}$  ohmios. Este objetivo general se dividió en los siguientes objetivos parciales:

- Análisis en diferentes sesiones de medida del estándar secundario *In-house* frente al NIST SRM-3133 a diversos niveles de concentración mediante CVG-MC-ICP-MS, con dos combinaciones de conos diferentes (estándar y *jet*), dos condiciones de plasma (húmedo y seco) y tres configuraciones de amplificadores diferentes (combinando los amplificadores tradicionales de  $10^{11} \Omega$  con los de  $10^{13} \Omega$ ).
- Evaluación de la exactitud y la precisión de los valores  $\delta$  del estándar secundario *In-house* obtenidos a diversos niveles de concentración mediante CVG-MC-ICP-MS, con las dos combinaciones de conos diferentes (estándar y *jet*), las dos condiciones de plasma (húmedo y seco) y las tres configuraciones de

---

<sup>222</sup> Koornneef, J.M., Nikogosian, I., van Bergen, M.J., Smeets, R., Bouman, C., Davies, G.R., 2015. TIMS analysis of Sr and Nd isotopes in melt inclusions from Italian potassium-rich lavas using prototype 1013 $\Omega$  amplifiers. Chem. Geol. 397, 14–23.

amplificadores diferentes (combinando los amplificadores tradicionales de  $10^{11} \Omega$  con los de  $10^{13} \Omega$ ).

- Propuesta de un protocolo para el análisis de la composición isotópica de Hg en muestras con bajo contenido de Hg ( $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$ ).
- Validación de la metodología propuesta mediante el análisis del estándar secundario NIST RM-8610 (UM-Almadén) frente al NIST SRM-3133.
- Análisis de varias muestras de agua superficial contaminada por Hg.

### D.5.3. Experimental

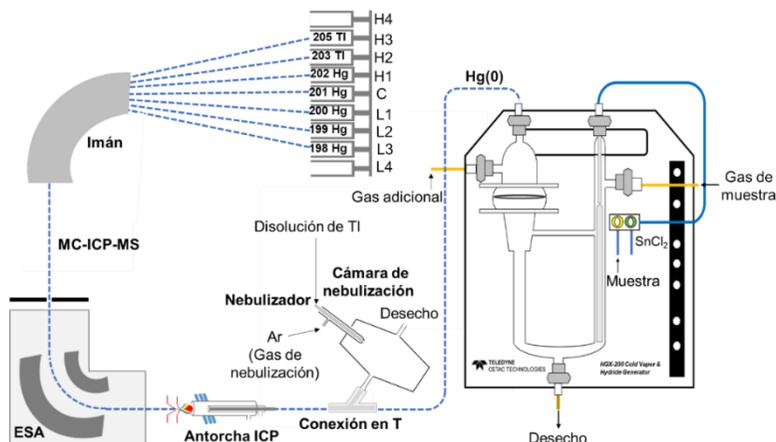
#### D.5.3.1. Instrumentación

Los principales equipos utilizados a lo largo de este quinto capítulo ya han sido descritos en el Experimental General (secciones **C.1.4.** y **C.1.2.**).

Se utilizó un equipo Neptune XT MC-ICP-MS (Thermo Scientific, Alemania) instalado en la Unidad de Investigación Atómica de la Universidad de Gante, equipado con una interfase *Jet* de alta eficiencia, acoplado a una Unidad de Generación de Vapor e Hidruros HGX-200 (Teledyne Cetac Technologies, EE.UU.).

Se evaluaron dos conjuntos de conos diferentes: (i) un cono *sampler* de Ni de tipo *Jet* y un cono *Skimmer* de Ni de tipo X, y (ii) un cono *sampler* de Ni estándar y un cono *Skimmer* de Ni de tipo H (Thermo Scientific, Alemania). Para simplificar, estas dos combinaciones se denominaron (i) conos *Jet* y (ii) conos estándar.

Se utilizaron un nebulizador concéntrico de PFA de  $100 \mu\text{L min}^{-1}$  y una cámara de nebulización con subunidades ciclónicas y de tipo Scott para la nebulización continua de la disolución de Tl en la que se basó la corrección interna de la discriminación de masas. La **Figura 64** muestra un diagrama del montaje instrumental utilizado en este capítulo, que ilustra la mezcla de los flujos de muestra obtenidos mediante CVG (Hg) y nebulización neumática (Tl) con una pieza en "T".



**Figura 64.** Representación esquemática del montaje instrumental CVG-MC-ICP-MS en condiciones de plasma húmedo.

Los parámetros experimentales del Neptune MC-ICP-MS se resumen en la **Tabla 34**. Las copas Faraday L3, L2, L1, C y H1 se utilizaron para monitorizar las señales de los isótopos de Hg  $^{198}\text{Hg}$ ,  $^{199}\text{Hg}$ ,  $^{200}\text{Hg}$ ,  $^{201}\text{Hg}$  y  $^{202}\text{Hg}$ , respectivamente, mientras que las copas Faraday H2 y H3 se utilizaron para monitorizar las señales de  $^{203}\text{Tl}$  y  $^{205}\text{Tl}$  en condiciones de plasma húmedo. Se evaluaron diferentes configuraciones de amplificadores: (i) amplificadores  $10^{11} \Omega$  para cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  para las copas Faraday L2, L1, H1, H2 y H3 y  $10^{13} \Omega$  para las copas Faraday L3 y C, y (iii)  $10^{11} \Omega$  para las copas Faraday L1, H2 y H3 y  $10^{13} \Omega$  para las copas Faraday L3, L2, C y H1. En el transcurso del desarrollo del trabajo de este capítulo, se adquirieron dos amplificadores adicionales de  $10^{13} \Omega$  (un total de 4), lo que explica por qué se evaluaron las condiciones (ii) y (iii).

Antes de cada sesión de medida, el software realizó automáticamente una rutina de calibración de ganancia y la integración de la línea base de realizó durante aproximadamente 630s. También se evaluó el uso de la corrección Tau para abordar las disparidades en el decaimiento de los amplificadores, ya que

estas son más evidentes en el caso de los amplificadores de  $10^{13} \Omega$ .<sup>223</sup> La corrección se llevó a cabo automáticamente utilizando el software del MC-ICP-MS.

La concentración de HgT se determinó utilizando un ICP-MS en tándem Agilent 8800 (ICP-MS/MS, Agilent Technologies, Japón). El sistema de introducción de la muestra consistió en un nebulizador MicroMist de  $400 \text{ L min}^{-1}$  y una cámara de nebulización tipo Scott refrigerada ( $2^\circ\text{C}$ ). El equipo ICP-MS/MS se utilizó en modo cuadrupolo único, en el que Q1 se utilizó como guía de iones, y la celda de colisión/reacción en modo "no gas". La cuantificación se realizó mediante calibración externa (curva de calibración) con TI como patrón interno para corregir los posibles efectos de la matriz, las derivas del equipo y las inestabilidades del plasma.

---

<sup>223</sup> Yamamoto, K., Asanuma, H., Takahashi, H., Hirata, T., 2021. In situ isotopic analysis of uranium using a new data acquisition protocol for  $10^{13} \text{ ohm}$  Faraday amplifiers. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 36(3), 668-675.

## Resultados

**Tabla 34.** Principales parámetros instrumentales de adquisición para el análisis isotópico de Hg por MC-ICP-MS.

Neptune XT MC-ICP-MS						
Parámetros instrumentales	Condiciones de plasma húmedo		Condiciones de plasma seco			
Potencia RF (W)	1250-1300		1250-1300			
Flujo de gas refrigerante (L min <sup>-1</sup> )	15		15			
Flujo de gas auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1		1			
Flujo de gas de nebulización (L min <sup>-1</sup> )	0,70-0,75		0,97-0,98			
Flujo de gas de arrastre (L min <sup>-1</sup> )	0,25-0,30		0,14-0,15			
Flujo de gas adicional (L min <sup>-1</sup> )	0,03-0,04		-			
Ratio de absorción de muestra (mL min <sup>-1</sup> )	0,7		0,7			
Ratio de absorción de TI (mL min <sup>-1</sup> )	0,17		-			
Ratio de absorción de SnCl <sub>2</sub> (mL min <sup>-1</sup> )	0,7		0,7			
Tiempo de absorción (s)	100		100			
Tiempo de lavado (s)	150		150			
Resolución	Baja resolución		Baja resolución			
Modo	Modo estático		Modo estático			
Cono de muestra	Estándar	Cono <i>Jet</i>	Estándar	Cono <i>Jet</i>		
Cono <i>Skimmer</i>	Tipo H	Tipo X	Tipo H	Tipo X		
Parámetros de adquisición						
Tiempo de integración (s)	4,194					
Bloques	5					
Ciclos/bloque	10					
Ciclos totales	50					
Configuración de copas						
L3	L2	L1	C	H1	H2	H3
( <sup>198</sup> Hg)	( <sup>199</sup> Hg)	( <sup>200</sup> Hg)	( <sup>201</sup> Hg)	( <sup>202</sup> Hg)	( <sup>203</sup> Tl)	( <sup>205</sup> Tl)
10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω
10 <sup>13</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>13</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω
10 <sup>13</sup> Ω	10 <sup>13</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>13</sup> Ω	10 <sup>13</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω	10 <sup>11</sup> Ω

## D.5.3.2. Materiales y reactivos

Se preparó una disolución de  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Reino Unido, 3%  $\text{SnCl}_2$  en 1,2 M HCl) de nivel de pureza pro-análisis para reducir el  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}(0)$ . Se obtuvo Milli-Q  $\text{H}_2\text{O}$  de alta pureza ( $> 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) a partir de un sistema de purificación de agua Milli-Q Element (Millipore, Francia), mientras que el HCl 12 M y el  $\text{HNO}_3$  14 M pro-análisis (ChemLab, Bélgica) se utilizando un sistema DST de purificación de ácidos Savillex (EE.UU.).

Se utilizaron disoluciones patrón de Hg (NIST SRM-3133) y Tl (NIST SRM 997) del NIST para la corrección externa e interna de la discriminación de masas, respectivamente. Para la optimización, desarrollo y validación del método se utilizó una disolución estándar de Hg previamente caracterizada *in-house* (IH) (Inorganic Ventures, Países Bajos).<sup>95</sup> También se utilizó el material de referencia secundario UM-Almadén (NIST RM-8610) para evaluar la exactitud y precisión de las medidas de las relaciones isotópicas de Hg.

## D.5.3.3. Procedimientos

En condiciones de plasma húmedo, el efecto de la discriminación de masas instrumental se corrigió mediante una combinación de una corrección interna basada en la ecuación de Russell,<sup>82</sup> utilizando la disolución patrón de Tl nebulizada de manera continua (NIST SRM 997), y una corrección externa basada en el estándar primario de Hg NIST SRM-3133 medido mediante la estrategia SSB. En condiciones de plasma seco, el efecto de la discriminación de masas instrumental se corrigió únicamente mediante corrección externa. Para una buena corrección del efecto de la discriminación de masas, se igualaron las concentraciones de Hg y el contenido de ácido de todas las muestras, estándares y materiales de referencia. Después de cada medida, se controló un blanco para evitar efectos de memoria y garantizar una señal de fondo lo suficientemente baja. También se evaluó el efecto de la sustracción del blanco.

Los valores  $\delta^{xxx}\text{Hg} \text{‰}$  y  $\Delta^{xxx}\text{Hg} \text{‰}$  se reportaron como se explicó en el Experimental General (sección **C.3.7.6.**), siguiendo las ecuaciones **(38)**, **(40)** y **(41)**.

En marzo de 2023, se recogieron muestras de agua superficial de tres lugares diferentes de Jove, Gijón (Asturias, España), utilizando tubos Falcon de 50 mL. De cada fuente de agua se recolectaron tres muestras de agua independientes, que posteriormente se acidificaron con HCl al 2%. Estas muestras se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis. Las fuentes de agua investigadas, La Parra (A1), La Piquera (A2) y El Muselín (A3), se encuentran situadas en una zona industrializada. La empresa municipal de aguas de Gijón (EMA) ha declarado que estas fuentes de agua no son aptas para el consumo humano debido a la presencia de "metales pesados".

### D.5.4. Resultados y discusión

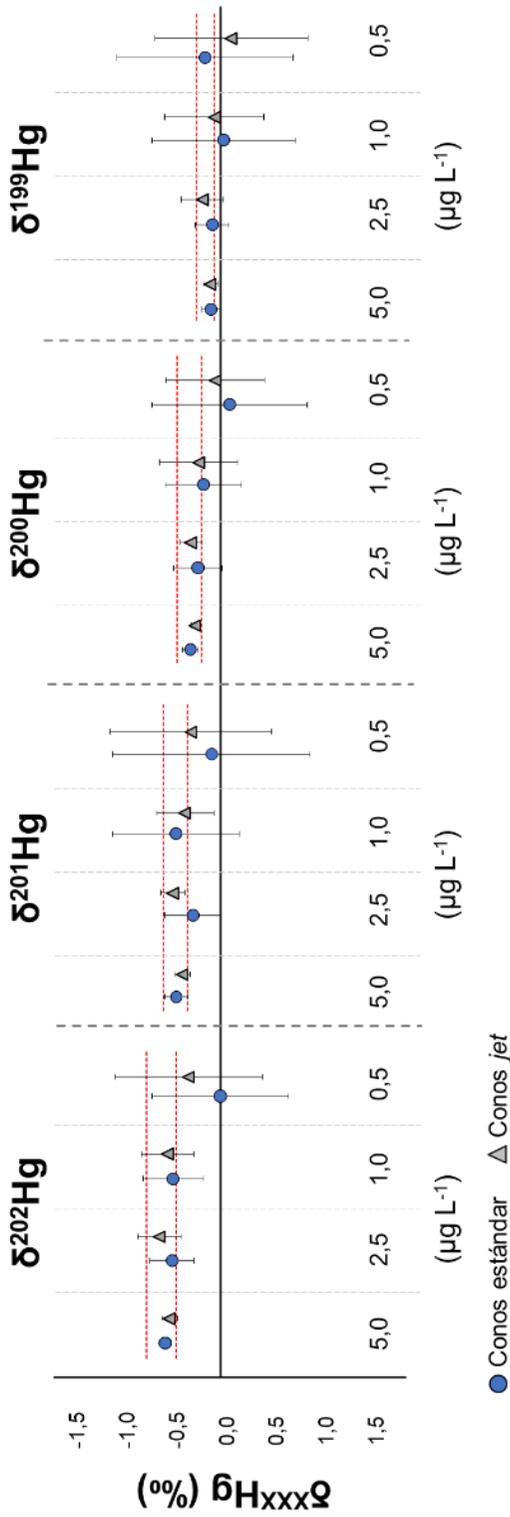
#### D.5.4.1. Evaluación del montaje instrumental

##### D.5.4.1.1. Comparación de dos combinaciones de conos diferentes

Se evaluaron la exactitud y la precisión de los resultados obtenidos utilizando dos juegos diferentes de conos (conos estándar y conos *Jet*) a niveles de concentración comprendidos entre 0,5 y 5,0 g L<sup>-1</sup>. Los parámetros de adquisición (tiempo de integración, número de bloques y de ciclos/bloque) se seleccionaron de acuerdo con valores previamente optimizados.<sup>95</sup> Los valores de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  del estándar IH se compararon con los presentados en un estudio previo que reportaba datos obtenidos a 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  Hg.<sup>95</sup>

La **Figura 65** muestra los valores  $\delta^{xxx}\text{Hg} \text{‰}$  (n=5) medios para el estándar IH obtenidos con las dos configuraciones de conos a concentraciones de 5,0, 2,5, 1,0 y 0,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  Hg. Las barras de error representan dos veces la desviación estándar (2SD), y las líneas rojas discontinuas representan el  $\pm 2\text{SD}$  de los valores  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  obtenidos previamente para el estándar IH<sup>95</sup>. Los valores presentados en la **Figura 65**, utilizados a modo de ejemplo, se adquirieron en condiciones de plasma

húmedo, utilizando amplificadores de  $10^{11} \Omega$ . Se sacaron conclusiones similares a partir de las diferentes configuraciones evaluadas, como se observa en las **Tabla 35**, **Tabla 36**, **Tabla 37** y **Tabla 38** para los valores  $\delta^{202}\text{Hg}$ ,  $\delta^{201}\text{Hg}$ ,  $\delta^{200}\text{Hg}$  y  $\delta^{199}\text{Hg}$ , respectivamente. Como puede observarse en la **Figura 65**, los valores medios obtenidos utilizando ambas configuraciones no mostraron diferencias significativas para los distintos niveles de concentración evaluados. Sin embargo, para el valor  $\delta^{201}\text{Hg}$ , se obtuvo una mejor concordancia con el valor de referencia del estándar IH con la configuración de conos *Jet* para dos sesiones de medida. En general, el uso de los conos *Jet* dio lugar a resultados más precisos.



**Figura 65.** Valores medios de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) para el estándar IH ( $n=5$ ) obtenidos a diferentes niveles de concentración con conos estándar y *jet* en condiciones de plasma húmedo y utilizando amplificadores de  $10^{11}$   $\Omega$ . Las líneas discontinuas rojas representan la media  $\pm$  2SD de los valores de IH obtenidos previamente<sup>65</sup>. Las barras de error corresponden al 2SD y se obtuvieron a partir de  $n=5$  medidas CVG-MC-ICP-MS.

**Tabla 35.** Valores medios  $\delta^{200}\text{Hg}$  (‰) para el IH (n=5) y 2SD obtenidos a diferentes niveles de concentración, dos combinaciones de conos (Estándar y *Jet*), dos condiciones de plasma (Húmedo y seco) y tres configuraciones de amplificadores (i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y (iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )).

Conos	Plasma	Ampli.	$\delta^{200}\text{Hg}$ (‰) $\pm$ 2SD						
			5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,50 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$
<b>IH<sup>95</sup></b>									
<b>-0,59 <math>\pm</math> 0,15</b>									
Estándar	Húmedo	(i)	-0,56 $\pm$ 0,06	-0,49 $\pm$ 0,22	-0,48 $\pm$ 0,30	0,00 $\pm$ 0,68			
Estándar	Húmedo	(ii)	-0,49 $\pm$ 0,26	-0,67 $\pm$ 0,10	-0,54 $\pm$ 0,28	-0,46 $\pm$ 0,08	-0,51 $\pm$ 1,05		
<i>Jet</i>	Húmedo	(i)	-0,51 $\pm$ 0,08	-0,61 $\pm$ 0,22	-0,53 $\pm$ 0,26	-0,32 $\pm$ 0,74	-0,37 $\pm$ 0,69		
<i>Jet</i>	Húmedo	(ii)		-0,63 $\pm$ 0,12	-0,65 $\pm$ 0,23	-0,43 $\pm$ 0,38			
<i>Jet</i>	Seco	(i)	-0,59 $\pm$ 0,06	-0,56 $\pm$ 0,06	-0,50 $\pm$ 0,15	-0,46 $\pm$ 0,36	-0,17 $\pm$ 0,82		
<i>Jet</i>	Seco	(ii)			-0,61 $\pm$ 0,10	-0,42 $\pm$ 0,35	-0,45 $\pm$ 0,43	-0,25 $\pm$ 0,63	
<i>Jet</i>	Húmedo	(iii)			-0,56 $\pm$ 0,10	-0,54 $\pm$ 0,18		-0,44 $\pm$ 0,45	
<i>Jet</i>	Seco	(iii)			-0,58 $\pm$ 0,23	-0,53 $\pm$ 0,10	-0,48 $\pm$ 0,28	-0,63 $\pm$ 0,42	-0,41 $\pm$ 0,54

**Tabla 36.** Valores medios  $\delta^{201}\text{Hg}$  (‰) para el IH ( $n=5$ ) y 2SD obtenidos a diferentes niveles de concentración, dos combinaciones de conos (Estándar y *Jet*), dos condiciones de plasma (Húmedo y seco) y tres configuraciones de amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{15} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y (iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )).

Conos	Plasma	Amp.	$\delta^{201}\text{Hg}$ (‰) $\pm$ 2SD						
			5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,50 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$
<b>IH<sup>95</sup></b>									
<b>-0,45 <math>\pm</math> 0,12</b>									
Estándar	Húmedo	(i)	-0,45 $\pm$ 0,12	-0,28 $\pm$ 0,28	-0,45 $\pm$ 0,64	-0,09 $\pm$ 0,99			
Estándar	Húmedo	(ii)	-0,41 $\pm$ 0,11	-0,44 $\pm$ 0,12	-0,51 $\pm$ 0,21	-0,32 $\pm$ 0,29	0,44 $\pm$ 0,46		
<i>Jet</i>	Húmedo	(i)	-0,39 $\pm$ 0,08	-0,48 $\pm$ 0,12	-0,36 $\pm$ 0,29	-0,30 $\pm$ 0,81	0,10 $\pm$ 1,02		
<i>Jet</i>	Húmedo	(ii)		-0,48 $\pm$ 0,13	-0,52 $\pm$ 0,14	-0,40 $\pm$ 0,15			
<i>Jet</i>	Seco	(i)	-0,48 $\pm$ 0,07	-0,41 $\pm$ 0,09	-0,36 $\pm$ 0,12	-0,28 $\pm$ 0,33	-0,24 $\pm$ 1,07		
<i>Jet</i>	Seco	(ii)		-0,43 $\pm$ 0,08	-0,39 $\pm$ 0,06	-0,39 $\pm$ 0,22	-0,37 $\pm$ 0,78		
<i>Jet</i>	Húmedo	(iii)		-0,40 $\pm$ 0,09	-0,44 $\pm$ 0,23		-0,25 $\pm$ 0,26		
<i>Jet</i>	Seco	(iii)		-0,45 $\pm$ 0,18	-0,43 $\pm$ 0,08	-0,37 $\pm$ 0,17	-0,39 $\pm$ 0,54	-0,29 $\pm$ 0,51	

**Tabla 37.** Valores medios  $\delta^{200}\text{Hg}$  (‰) para el IH (n=5) y 2SD obtenidos a diferentes niveles de concentración, dos combinaciones de conos (Estándar y *Jet*), dos condiciones de plasma (Húmedo y seco) y tres configuraciones de amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y (iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )).

Conos	Plasma	Amp.	$\delta^{200}\text{Hg}$ (‰) $\pm$ 2SD						
			5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,50 $\mu\text{g L}^{-1}$	1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$
<b>IH<sup>95</sup></b>									
<b>- 0,30 <math>\pm</math> 0,12</b>									
Estándar	Húmedo	(i)	-0,29 $\pm$ 0,08	-0,22 $\pm$ 0,24	-0,16 $\pm$ 0,38	0,10 $\pm$ 0,78			
Estándar	Húmedo	(ii)	-0,21 $\pm$ 0,19	-0,32 $\pm$ 0,17	-0,38 $\pm$ 0,27	-0,20 $\pm$ 0,34	-0,05 $\pm$ 0,36		
<i>Jet</i>	Húmedo	(i)	-0,25 $\pm$ 0,03	-0,29 $\pm$ 0,11	-0,21 $\pm$ 0,39	-0,04 $\pm$ 0,50	0,23 $\pm$ 0,92		
<i>Jet</i>	Húmedo	(ii)		-0,33 $\pm$ 0,10	-0,41 $\pm$ 0,21	-0,13 $\pm$ 0,26			
<i>Jet</i>	Seco	(i)	-0,30 $\pm$ 0,08	-0,28 $\pm$ 0,07	-0,23 $\pm$ 0,11	-0,30 $\pm$ 0,47	-0,03 $\pm$ 1,03		
<i>Jet</i>	Seco	(ii)			-0,30 $\pm$ 0,14	-0,20 $\pm$ 0,43	-0,19 $\pm$ 0,24	-0,25 $\pm$ 0,60	
<i>Jet</i>	Húmedo	(iii)			-0,32 $\pm$ 0,17	-0,21 $\pm$ 0,28		-0,15 $\pm$ 0,64	
<i>Jet</i>	Seco	(iii)			-0,29 $\pm$ 0,35	-0,25 $\pm$ 0,16	-0,31 $\pm$ 0,24	-0,05 $\pm$ 0,52	-0,10 $\pm$ 0,30

**Tabla 38.** Valores medios  $\delta^{199}\text{Hg}$  (‰) para el IH ( $n=5$ ) y 2SD obtenidos a diferentes niveles de concentración, dos combinaciones de conos (Estándar y *Jet*), dos condiciones de plasma (Húmedo y seco) y tres configuraciones de amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y (iii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )).

Conos		Plasma	Amp.	5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	2,50 $\mu\text{g L}^{-1}$	1 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$	0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$
$\delta^{199}\text{Hg}$ (‰) $\pm$ 2SD										
<b>IH<sup>95</sup></b>										
<b>-0,14 <math>\pm</math> 0,09</b>										
Estándar	Húmedo	(i)	-0,08 $\pm$ 0,09	-0,07 $\pm$ 0,17	0,04 $\pm$ 0,72	-0,15 $\pm$ 0,88				
Estándar	Húmedo	(ii)	-0,02 $\pm$ 0,27	-0,19 $\pm$ 0,18	-0,09 $\pm$ 0,40	0,00 $\pm$ 0,51	0,48 $\pm$ 0,66			
<i>Jet</i>	Húmedo	(i)	-0,09 $\pm$ 0,07	-0,17 $\pm$ 0,21	-0,05 $\pm$ 0,50	0,12 $\pm$ 0,77	0,29 $\pm$ 0,70			
<i>Jet</i>	Húmedo	(ii)		-0,12 $\pm$ 0,14	-0,23 $\pm$ 0,18	-0,15 $\pm$ 0,25				
<i>Jet</i>	Seco	(i)	-0,17 $\pm$ 0,02	-0,11 $\pm$ 0,06	-0,06 $\pm$ 0,14	-0,07 $\pm$ 0,51	-0,19 $\pm$ 0,73			
<i>Jet</i>	Seco	(ii)		-0,09 $\pm$ 0,15	-0,06 $\pm$ 0,13	-0,33 $\pm$ 0,68	0,30 $\pm$ 1,33			
<i>Jet</i>	Húmedo	(iii)		-0,12 $\pm$ 0,11	-0,15 $\pm$ 0,09		-0,10 $\pm$ 0,65			
<i>Jet</i>	Seco	(iii)		-0,15 $\pm$ 0,14	-0,12 $\pm$ 0,08	-0,09 $\pm$ 0,35	-0,15 $\pm$ 0,39	-0,09 $\pm$ 0,63		

Aunque no se aplicó ninguna corrección teniendo en cuenta los blancos, los resultados de las medidas substrayendo el blanco también se pueden encontrar en la **Tabla 39**. En términos generales, la diferencia entre los valores con y sin substracción del blanco es mínima, lo que indica que el efecto del blanco puede considerarse despreciable en términos de precisión experimental.

**Tabla 39.** Valores promedio de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) para el estándar IH (n=5) y desviación estándar obtenidos con los conos estándar y *jet* en condiciones de plasma húmedo y con los amplificadores de  $10^{11} \Omega$  a diferentes niveles de concentración. i) Conos estándar, plasma húmedo, Ampl.  $10^{11} \Omega$ . ii) Conos jet, plasma húmedo, Ampl.  $10^{11} \Omega$ .

(i)	Blanco	$\delta^{199}\text{Hg} \pm \text{SD}$	$\delta^{200}\text{Hg} \pm \text{SD}$	$\delta^{201}\text{Hg} \pm \text{SD}$	$\delta^{202}\text{Hg} \pm \text{SD}$
5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Sin substracer	-0,08 $\pm$ 0,05	-0,29 $\pm$ 0,04	-0,45 $\pm$ 0,06	-0,56 $\pm$ 0,03
	Substrayendo	-0,10 $\pm$ 0,08	-0,30 $\pm$ 0,07	-0,47 $\pm$ 0,10	-0,58 $\pm$ 0,05
2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	Sin substracer	-0,07 $\pm$ 0,09	-0,22 $\pm$ 0,12	-0,28 $\pm$ 0,14	-0,49 $\pm$ 0,11
	Substrayendo	0,01 $\pm$ 0,05	-0,21 $\pm$ 0,08	-0,22 $\pm$ 0,09	-0,44 $\pm$ 0,10
1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Sin substracer	0,04 $\pm$ 0,36	-0,16 $\pm$ 0,19	-0,45 $\pm$ 0,32	-0,48 $\pm$ 0,15
	Substrayendo	-0,01 $\pm$ 0,30	-0,10 $\pm$ 0,20	-0,46 $\pm$ 0,28	-0,45 $\pm$ 0,09
0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	Sin substracer	-0,15 $\pm$ 0,44	0,10 $\pm$ 0,39	-0,09 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,34
	Substrayendo	-0,01 $\pm$ 0,73	0,52 $\pm$ 0,25	-0,11 $\pm$ 0,30	0,22 $\pm$ 0,17
(ii)					
5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Sin substracer	-0,09 $\pm$ 0,04	-0,25 $\pm$ 0,02	-0,39 $\pm$ 0,04	-0,51 $\pm$ 0,04
	Substrayendo	-0,10 $\pm$ 0,06	-0,25 $\pm$ 0,05	-0,41 $\pm$ 0,09	-0,55 $\pm$ 0,09
2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	Sin substracer	-0,17 $\pm$ 0,11	-0,29 $\pm$ 0,06	-0,48 $\pm$ 0,06	-0,61 $\pm$ 0,11
	Substrayendo	-0,18 $\pm$ 0,16	-0,31 $\pm$ 0,10	-0,54 $\pm$ 0,06	-0,66 $\pm$ 0,11
1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$	Sin substracer	-0,05 $\pm$ 0,25	-0,21 $\pm$ 0,20	-0,36 $\pm$ 0,14	-0,53 $\pm$ 0,13
	Substrayendo	0,07 $\pm$ 0,21	-0,09 $\pm$ 0,18	-0,28 $\pm$ 0,22	-0,45 $\pm$ 0,18
0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$	Sin substracer	0,12 $\pm$ 0,38	-0,04 $\pm$ 0,25	-0,30 $\pm$ 0,40	-0,32 $\pm$ 0,37
	Substrayendo	0,27 $\pm$ 0,71	-0,04 $\pm$ 0,56	-0,45 $\pm$ 0,60	-0,26 $\pm$ 0,69

## Resultados

---

La **Tabla 40** muestra la precisión interna, expresada como la desviación estándar relativa promedio (RSD, %) y SD, para las relaciones isotópicas de Hg obtenidas a partir de seis medidas de una disolución NIST SRM-3133 de  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  bajo varias configuraciones. Como se puede observar, se logró una precisión interna significativamente mejor para todas las relaciones isotópicas de Hg cuando las medidas se realizaron con los conos *Jet* (valores de RSD% que oscilan entre 0,0048 y 0,0055 en comparación con los valores de RSD% obtenidos con los conos estándar que van de 0,0074 a 0,082). Los valores promedio de RSD% para las relaciones isotópicas obtenidas a partir de medidas a concentraciones decrecientes se pueden encontrar en las **Tabla 41**, **Tabla 42**, **Tabla 43** y **Tabla 44**. A medida que disminuye el nivel de concentración, los valores promedio de RSD% aumentan.

**Tabla 40.** Valores promedio de RSD (%) y las SD correspondientes para las relaciones isotópicas de Hg de 6 mediciones de una disolución estándar de NIST SRM-3133 de 1 µg L<sup>-1</sup> obtenidas bajo varias configuraciones: dos configuraciones de conos (Estándar vs. *Jet*), dos condiciones de plasma (húmedo vs. seco) y tres configuraciones de amplificadores ((i) amplificador de 10<sup>11</sup> Ω para cada copa de Faraday, (ii) 10<sup>11</sup> Ω para las copas de Faraday L2 (<sup>199</sup>Hg), L1 (<sup>200</sup>Hg), H1 (<sup>202</sup>Hg) y 10<sup>13</sup> Ω para las copas de Faraday L3 (<sup>198</sup>Hg) y C (<sup>201</sup>Hg), y (iii) 10<sup>11</sup> Ω para las copas de Faraday L1 (<sup>200</sup>Hg) y 10<sup>13</sup> Ω para las copas de Faraday L3 (<sup>198</sup>Hg), L2 (<sup>199</sup>Hg), C (<sup>201</sup>Hg) y H1 (<sup>202</sup>Hg)).

Conos / Plasma	Amp		<sup>199</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	<sup>200</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	<sup>201</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	<sup>202</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	<sup>205</sup> Tl/ <sup>203</sup> Tl
Estándar/ Húmedo	(i)	Media	0,0077	0,0080	0,0082	0,0074	0,0019
		SD	0,0002	0,0005	0,0004	0,0005	0,0009
Estándar/ Húmedo	(ii)	Media	0,0108	0,0100	0,0052	0,0094	0,0016
		SD	0,0020	0,0012	0,0006	0,0016	0,0001
<i>Jet</i> / Húmedo	(i)	Media	0,0055	0,0050	0,0055	0,0048	0,0011
		SD	0,0004	0,0003	0,0006	0,0004	0,0001
<i>Jet</i> / Húmedo	(ii)	Media	0,0075	0,0068	0,0041	0,0071	0,0014
		SD	0,0006	0,0007	0,0004	0,0007	0,0001
<i>Jet</i> / Seco	(i)	Media	0,0043	0,0042	0,0046	0,0041	
		SD	0,0002	0,0005	0,0003	0,0005	
<i>Jet</i> / Seco	(ii)	Media	0,0076	0,0076	0,0034	0,0078	
		SD	0,0017	0,0016	0,0002	0,0016	
<i>Jet</i> / Húmedo	(iii)	Media	0,0040	0,0115	0,0044	0,0044	0,0030
		SD	0,0005	0,0015	0,0010	0,0003	0,0002
<i>Jet</i> / Seco	(iii)	Media	0,0035	0,0132	0,0042	0,0045	
		SD	0,0003	0,0037	0,0008	0,0007	

**Tabla 41.** Valores medios RSD(%) y SD para las relaciones isotópicas de Hg de seis medidas realizadas a niveles de concentración decrecientes de una disolución SRM-3133 del NIST bajo varias configuraciones: dos configuraciones de cono (estándar y  $\beta/\theta$ ), dos condiciones de plasma (húmedo y seco) y tres configuraciones de los amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y  $10^{11} \Omega$  en las copas de Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{198}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )).

Conos	Plasma	Amp.	5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$		2,50 $\mu\text{g L}^{-1}$		1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$		0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$		0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$		
			Media	SD									
Estándar	Húmedo	(i)	$^{199}\text{Hg}/$	0,0026	0,0003	0,0037	0,0005	0,0077	0,0002	0,0248	0,0317		
			$^{198}\text{Hg}$										
			$^{200}\text{Hg}/$	0,0026	0,0004	0,0040	0,0003	0,0080	0,0005	0,0196	0,0204		
			$^{198}\text{Hg}$										
			$^{201}\text{Hg}/$	0,0027	0,0002	0,0044	0,0006	0,0082	0,0004	0,0217	0,0216		
			$^{198}\text{Hg}$										
Estándar	Húmedo	(ii)	$^{202}\text{Hg}/$	0,0026	0,0003	0,0037	0,0004	0,0074	0,0005	0,0195	0,0208		
			$^{198}\text{Hg}$										
			$^{199}\text{Hg}/$	0,0096	0,0017	0,0095	0,0020	0,0108	0,0020	0,0124	0,0007	0,0215	0,0010
			$^{198}\text{Hg}$										
			$^{200}\text{Hg}/$	0,0094	0,0019	0,0091	0,0016	0,0100	0,0012	0,0124	0,0007	0,0179	0,0024
			$^{198}\text{Hg}$										
Estándar	Húmedo	(ii)	$^{201}\text{Hg}/$	0,0024	0,0003	0,0031	0,0005	0,0052	0,0006	0,0075	0,0006	0,0132	0,0016
			$^{198}\text{Hg}$										
			$^{202}\text{Hg}/$	0,0093	0,0020	0,0091	0,0020	0,0094	0,0016	0,0111	0,0009	0,0182	0,0040
			$^{198}\text{Hg}$										

**Tabla 42.** Valores medios RSD(%) y SD para las relaciones isotópicas de Hg de seis medidas realizadas a niveles de concentración decrecientes de una disolución SRM-3133 del NIST bajo varias configuraciones: dos configuraciones de cono (estándar y *jet*), dos condiciones de plasma (húmedo y seco) y tres configuraciones de los amplificadores ((i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{201}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y  $10^{11} \Omega$  en las copas de Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )).

Conos	Plasma	Amp.	5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$		2,50 $\mu\text{g L}^{-1}$		1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$		0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$		
			Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	
<i>Jet</i>	Húmedo	(i)	$^{199}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$	0,0020	0,0002	0,0029	0,0003	0,0055	0,0004	0,0089	0,0007
			$^{200}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$	0,0018	0,0002	0,0027	0,0003	0,0050	0,0003	0,0079	0,0005
			$^{201}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$	0,0022	0,0002	0,0030	0,0002	0,0055	0,0006	0,0097	0,0008
			$^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$	0,0018	0,0001	0,0027	0,0003	0,0048	0,0004	0,0082	0,0007
			$^{199}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$			0,0061	0,0011	0,0075	0,0006	0,0101	0,0008
			$^{200}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$			0,0064	0,0013	0,0068	0,0007	0,0094	0,0016
<i>Jet</i>	Húmedo	(ii)	$^{201}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$	0,0027	0,0004	0,0041	0,0004	0,0060	0,0005		
			$^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$	0,0063	0,0014	0,0071	0,0007	0,0094	0,0013		

**Tabla 43.** Valores medios RSD(%) y SD para las relaciones isotópicas de Hg de seis medidas realizadas a niveles de concentración decrecientes de una disolución SRM-3133 del NIST bajo varias configuraciones: dos configuraciones de cono (estándar y jet), dos condiciones de plasma (húmedo y seco) y tres configuraciones de los amplificadores (i)  $10^{11} \Omega$  en cada copa Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  en las copas Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ), H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ), y C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  en las copas de Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), C ( $^{201}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ )).

Conos	Plasma	Amp.	5,00 $\mu\text{g L}^{-1}$		2,50 $\mu\text{g L}^{-1}$		1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$		0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$		0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$		0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$		0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$			
			Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
<i>Jet</i>	Seco	(i)	$^{199}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$	0,0028	0,0031	0,0024	0,0003	0,0043	0,0002	0,0069	0,0009	0,0123	0,0014					
				0,0028	0,0032	0,0022	0,0002	0,0042	0,0005	0,0065	0,0008	0,0121	0,0022					
			0,0017	0,0004	0,0024	0,0003	0,0046	0,0003	0,0074	0,0009	0,0133	0,0016						
			0,0028	0,0034	0,0022	0,0004	0,0041	0,0005	0,0059	0,0006	0,0119	0,0020						
			0,0064	0,0015	0,0076	0,0017	0,0090	0,0007	0,0128	0,0024	0,0207	0,0030						
			0,0060	0,0011	0,0076	0,0016	0,0084	0,0013	0,0127	0,0030	0,0197	0,0029						
<i>Jet</i>	Seco	(ii)	$^{201}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$	0,0028	0,0003	0,0034	0,0002	0,0046	0,0005	0,0068	0,0007	0,0135	0,0009					
				0,0078	0,0016	0,0085	0,0011	0,0115	0,0022	0,0178	0,0019	0,0178	0,0019					
			$^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$															

**Tabla 44.** Valores medios RSD(%) y SD para las relaciones isotópicas de Hg de seis medidas realizadas a niveles de concentración decrecientes de una disolución SRM-3133 del NIST bajo varias configuraciones: dos configuraciones de cono (estándar y *jet*), dos condiciones de plasma (húmedo y seco) y tres configuraciones de los amplificadores ((i) 10<sup>11</sup> Ω en las copas Faraday, (ii) 10<sup>11</sup> Ω en las copas Faraday L2 (<sup>199</sup>Hg), L1 (<sup>200</sup>Hg), H1 (<sup>202</sup>Hg) y 10<sup>13</sup> Ω en las copas de Faraday L3 (<sup>198</sup>Hg) y C (<sup>201</sup>Hg) y (<sup>198</sup>Hg) y C (<sup>201</sup>Hg) y C (<sup>201</sup>Hg), y iii) 10<sup>11</sup> Ω en las copas de Faraday L1 (<sup>200</sup>Hg) y 10<sup>13</sup> Ω en las copas de Faraday L3 (<sup>198</sup>Hg), L2 (<sup>199</sup>Hg), C (<sup>201</sup>Hg) y H1 (<sup>202</sup>Hg)).

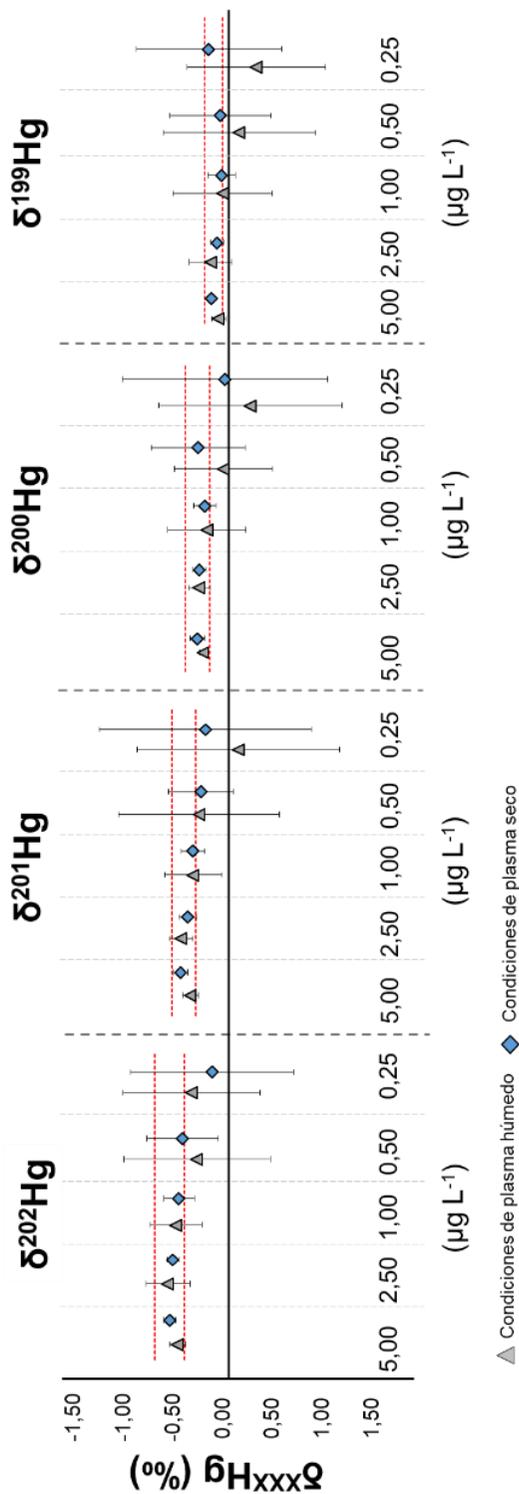
Conos	Plasma	Amp.	1,00 µg L <sup>-1</sup>	0,50 µg L <sup>-1</sup>	0,25 µg L <sup>-1</sup>	0,10 µg L <sup>-1</sup>	0,05 µg L <sup>-1</sup>				
			Media	SD	Media	SD	Media	SD			
<i>Jet</i>	Húmedo	(i)	<sup>199</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	0,0040	0,0005	0,0051	0,0005	0,0172	0,0013		
			<sup>200</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	0,0115	0,0015	0,0120	0,0013	0,0266	0,0029		
		(iii)	<sup>201</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	0,0044	0,0010	0,0059	0,0008	0,0173	0,0012		
	Seco	(i)	<sup>202</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	0,0044	0,0003	0,0054	0,0006	0,0161	0,0022		
			<sup>199</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	0,0035	0,0003	0,0045	0,0005	0,0105	0,0007	0,0156	
		(iii)	<sup>200</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	0,0132	0,0037	0,0104	0,0007	0,0124	0,0017	0,0179	
<i>Jet</i>	Seco	(i)	<sup>201</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	0,0042	0,0008	0,0049	0,0003	0,0109	0,0014	0,0161	
		(ii)	<sup>202</sup> Hg/ <sup>198</sup> Hg	0,0045	0,0007	0,0048	0,0006	0,0060	0,0007	0,0104	0,0018
		(iii)								0,0151	0,0017

### D.5.4.1.2. Comparación de las condiciones de plasma húmedo y seco

Se realizaron experimentos para comparar la precisión y exactitud de los valores de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  bajo condiciones de plasma húmedo y seco. Los resultados se obtuvieron utilizando los parámetros de adquisición de datos previamente optimizados<sup>95</sup> a varios niveles de concentración. En condiciones de plasma húmedo, la corrección interna de la discriminación de masas se llevó a cabo mediante la nebulización continua de una disolución de TI y el método SSB. En condiciones de plasma seco, solo se aplicó la corrección externa. Las intensidades de la señal en condiciones de plasma seco fueron aproximadamente el doble de las obtenidas en condiciones de plasma húmedo. Por ejemplo, en condiciones de plasma seco, las intensidades de la señal del  $^{202}\text{Hg}$  a un nivel de concentración de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  fue de  $2,80 \times 10^{-13}$  A (280 mV) mientras que, en condiciones de plasma húmedo, la intensidad de la señal disminuyó a  $1,77 \times 10^{-13}$  A (177 mV). Esto coincide con los resultados obtenidos en el capítulo anterior.

Los valores promedio de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) ( $n=5$ ) para el estándar IH obtenidos bajo las condiciones de plasma seco y húmedo a niveles de concentración que van desde  $0,25$  hasta  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  se muestran en la **Figura 66** y en las **Tabla 35**, **Tabla 36**, **Tabla 37** y **Tabla 38**. La **Figura 66** muestra los valores obtenidos con los amplificadores de  $10^{11} \Omega$  y los conos *Jet* bajo condiciones de plasma seco y húmedo. Las líneas punteadas rojas representan el promedio  $\pm 2\text{SD}$  de los valores de IH obtenidos previamente<sup>95</sup>. Como era de esperar, los valores de  $2\text{SD}$  aumentan tanto para plasma húmedo como seco a medida que disminuye la concentración de Hg. Para la mayoría de los valores de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) y de los niveles de concentración, se establece una mejor concordancia con los valores de referencia en condiciones de plasma seco. Según los resultados mostrados en la **Tabla 40**, los valores más bajos de RSD se obtuvieron en condiciones de plasma seco utilizando los conos *Jet* y amplificadores de  $10^{11} \Omega$ . Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la precisión interna entre las diferentes

configuraciones a una concentración de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg, a pesar de que las intensidades de la señal fueron más altas en condiciones de plasma seco (**Tabla 40**). Las **Tabla 41**, **Tabla 42**, **Tabla 43** y **Tabla 44** también ilustran que los valores de RSD aumentan a medida que disminuye el nivel de concentración.



**Figura 66.** Valores promedio  $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$  (‰) para la disolución IH (n=5) obtenidos a diferentes niveles de concentración bajo condiciones de plasma húmedo y seco, utilizando amplificadores de  $10^{11}$   $\Omega$  y conos Jet. Las líneas punteadas rojas representan el promedio  $\pm 2\text{SD}$  de los valores IH obtenidos previamente<sup>85</sup>. Las barras de error corresponden a  $2\text{SD}$  y se obtuvieron a partir de n=5 medidas de CVG-MC-ICP-MS.

D.5.4.1.3. Comparación entre los amplificadores de  $10^{11} \Omega$  y  $10^{13} \Omega$

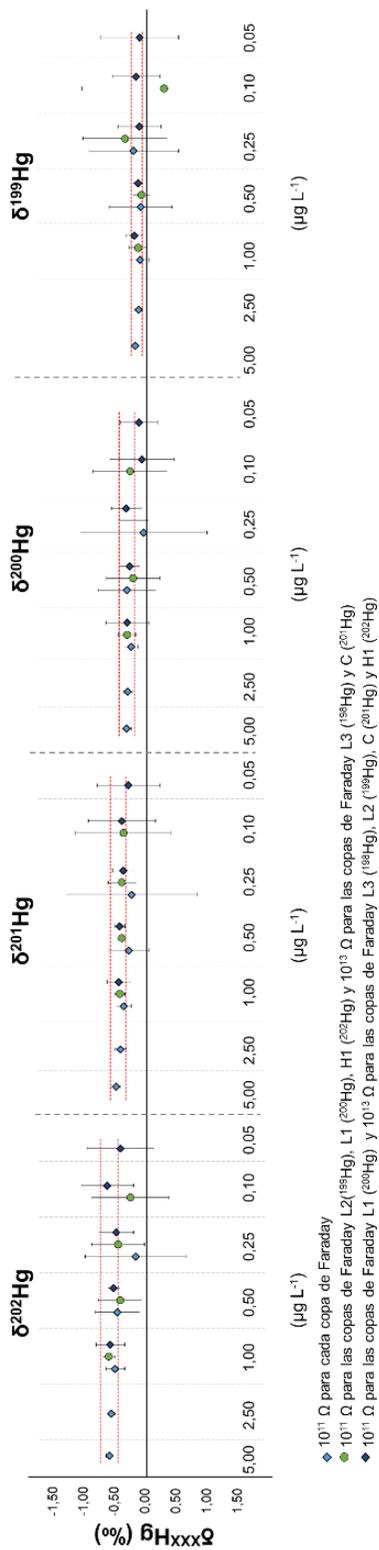
Se probaron tres configuraciones diferentes de las copas de Faraday y los amplificadores. Inicialmente, solo se disponía de dos amplificadores de  $10^{13} \Omega$ , pero al finalizar las tareas relacionadas con este quinto capítulo, el instrumento de MC-ICP-MS estaba equipado con un total de cuatro amplificadores de  $10^{13} \Omega$ . En la primera configuración, todas las copas de Faraday estaban conectadas a amplificadores de  $10^{11} \Omega$ . En la segunda configuración, dos amplificadores de  $10^{13} \Omega$  estaban conectados a las copas de Faraday que monitorizaban los isótopos minoritarios de Hg,  $^{198}\text{Hg}$  y  $^{201}\text{Hg}$ , utilizando las copas de Faraday L3 y C. En la tercera configuración, las intensidades de señal de todos los isótopos de Hg, excepto el  $^{200}\text{Hg}$ , se recolectaron en copas de Faraday conectadas a amplificadores de  $10^{13} \Omega$ .

La **Figura 67** aporta una comparación de los valores promedio de  $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$  (‰) (n=5) para la disolución IH obtenidos con las tres configuraciones diferentes de los amplificadores bajo condiciones de plasma seco, utilizando los conos *Jet*. Las líneas punteadas rojas representan el promedio  $\pm 2\text{SD}$  de los valores del IH obtenidos previamente<sup>95</sup>, y las barras de error representan  $\pm 2\text{SD}$  de los valores experimentales. Se observó que los amplificadores de  $10^{13} \Omega$  se saturaban a niveles de concentración superiores a  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ , por lo que los valores obtenidos a niveles de concentración de 2,5 y  $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg solo se muestran para la primera configuración. Cabe destacar que los valores promedio de  $\delta^{200}\text{Hg}$  y  $\delta^{201}\text{Hg}$  para la solución IH obtenidos con la segunda y tercera configuración de amplificadores fueron adquiridos bajo las mismas condiciones instrumentales, por lo que las diferencias deben atribuirse a la variabilidad entre diferentes sesiones de medida. Concretamente, la precisión y la exactitud mejoraron significativamente cuando se utilizaron más amplificadores de  $10^{13} \Omega$ , como se puede apreciar al estudiar los valores de  $\delta^{199}\text{Hg}$  y  $\delta^{202}\text{Hg}$ . Los valores promedio de  $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$  (‰) para la disolución IH obtenidos bajo diferentes configuraciones del

## Resultados

---

equipo se resumen en las **Tabla 35**, **Tabla 36**, **Tabla 37** y **Tabla 38** para  $\delta^{202}\text{Hg}$ ,  $\delta^{201}\text{Hg}$ ,  $\delta^{200}\text{Hg}$  y  $\delta^{199}\text{Hg}$ , respectivamente. Con la tercera configuración de amplificadores (usando cuatro amplificadores de  $10^{13} \Omega$ ) bajo condiciones de plasma seco y con conos *Jet*, los resultados promedio de las relaciones isotópicas para la disolución IH obtenidos a un nivel de concentración de  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  son similares a los valores obtenidos en otro estudio a una concentración de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ <sup>95</sup>. Esto representa una mejora significativa, ya que permite la determinación de la composición isotópica de Hg en muestras que contienen concentraciones de Hg 20 veces más bajas con el mismo nivel de precisión.



**Figura 67.** Valores promedio de  $\delta^{Xxx}\text{Hg}$  (‰) para la disolución IH ( $n=5$ ) obtenidos a diferentes niveles de concentración en condiciones de plasma seco, con los conos /et/ y utilizando tres configuraciones de amplificadores diferentes: (i)  $10^{11} \Omega$  para cada copa de Faraday, (ii)  $10^{11} \Omega$  para las copas de Faraday L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L1 ( $^{200}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  para las copas de Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ) y C ( $^{201}\text{Hg}$ ), y (iii)  $10^{11} \Omega$  para las copas de Faraday L1 ( $^{199}\text{Hg}$ ) y  $10^{13} \Omega$  para las copas de Faraday L3 ( $^{199}\text{Hg}$ ), L2 ( $^{199}\text{Hg}$ ) y H1 ( $^{202}\text{Hg}$ ). Las líneas rojas discontinuas representan el promedio  $\pm$  2SD de los valores IH obtenidos previamente<sup>95</sup>. Las barras de error corresponden a 2SD y se obtuvieron a partir de  $n=5$  medidas CVG-MC-ICP-MS.

## Resultados

---

El promedio de los valores RSD(%) de las medidas de las relaciones isotópicas aumentó significativamente al combinar dos amplificadores diferentes para la recolección de los isótopos  $^{198}\text{Hg}$  y  $^{xxx}\text{Hg}$ , respectivamente, en comparación con los valores promedio de RSD(%) cuando se usó únicamente un tipo de amplificador (**Tabla 40**). Se ha de tener en cuenta que, en la configuración (ii), las relaciones isotópicas  $^{199}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$ ,  $^{200}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$  y  $^{202}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$  se obtuvieron combinando dos tipos de amplificadores, mientras que en la configuración (iii), solo la relación isotópica  $^{200}\text{Hg}/^{198}\text{Hg}$  se obtuvo con dos tipos de amplificadores.

Se evaluó el efecto de la corrección tau para abordar las diferencias en el tiempo de respuesta del detector al combinar dos tipos de amplificadores. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas, ni para los valores de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) ni para los valores de RSD(%) de las relaciones isotópicas de Hg, como se muestra en la **Tabla 45**.

**Tabla 45.** Valores promedio de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) del estándar IH (n=5) y SD y valores promedio RSD % de las relaciones isotópicas de Hg del NIST SRM 3133 (n=6) y SD obtenidos a varios niveles de concentración, con y sin corrección tau.

Tau	$\delta^{196}\text{Hg}$	$\delta^{200}\text{Hg}$	$\delta^{201}\text{Hg}$	$\delta^{202}\text{Hg}$	$^{199}\text{Hg}/^{196}\text{Hg}$	$^{200}\text{Hg}/^{196}\text{Hg}$	$^{201}\text{Hg}/^{196}\text{Hg}$	$^{202}\text{Hg}/^{196}\text{Hg}$
1.00 $\mu\text{g L}^{-1}$	Media	-0.13	-0.308	-0.423	-0.617	0.007	0.007	0.003
	SD	0.105	0.056	0.036	0.041	0.001	0.002	0
	Media	-0.095	-0.296	-0.426	-0.606	0.008	0.008	0.003
	SD	0.073	0.072	0.041	0.051	0.002	0.002	0
0.50 $\mu\text{g L}^{-1}$	Media	-0.129	-0.242	-0.383	-0.47	0.009	0.008	0.005
	SD	0.046	0.146	0.038	0.119	0.001	0.001	0.001
	Media	-0.064	-0.197	-0.394	-0.418	0.009	0.008	0.005
	SD	0.067	0.217	0.03	0.177	0.001	0.001	0
0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$	Media	-0.27	-0.151	-0.393	-0.441	0.012	0.012	0.007
	SD	0.322	0.182	0.105	0.194	0.001	0.002	0.001
	Media	-0.33	-0.193	-0.394	-0.452	0.013	0.013	0.007
	SD	0.342	0.119	0.11	0.214	0.002	0.003	0.001
0.10 $\mu\text{g L}^{-1}$	Media	0.323	-0.187	-0.359	-0.229	0.021	0.019	0.014
	SD	0.627	0.317	0.392	0.335	0.003	0.002	0.001
	Media	0.301	-0.247	-0.368	-0.254	0.021	0.02	0.013
	SD	0.664	0.302	0.39	0.313	0.003	0.003	0.001

### D.5.4.2. Evaluación de los parámetros de adquisición de datos

Para evaluar el impacto de los parámetros de adquisición de datos en las medidas de las relaciones isotópicas con amplificadores de  $10^{13} \Omega$ , se disminuyó el tiempo de integración, mientras que se aumentó el número de ciclos. De acuerdo con la bibliografía<sup>224</sup>, solo el número final de ciclos, en lugar del número de bloques, afecta a la precisión y a la exactitud de las medidas de relaciones isotópicas. Por ello, se evaluaron dos métodos de adquisición: el método previamente optimizado (tiempo de integración de 4,194 s, 5 bloques y 1 ciclo)<sup>95</sup> y un segundo método (tiempo de integración de 2,097 s, 1 bloque y 100 ciclos), y se compararon los datos correspondientes. La exactitud y precisión interna de los resultados se evaluaron mediante la medida de una disolución estándar IH a un nivel de concentración de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg. La **Tabla 46** muestra que se obtuvo una mayor exactitud y precisión interna con el primer método, que ya se había utilizado para comparar el efecto de las diferentes configuraciones instrumentales.

---

<sup>224</sup> Hintelmann, H., Lu, S.Y., 2003. High precision isotope ratio measurements of mercury isotopes in cinnabar ores using multi-collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst* 128, 635–639

**Tabla 46.** Comparación de los valores promedio de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) del estándar IH (n=5) y los valores promedio de SD y RSD(%) de los resultados de las relaciones isotópicas de Hg del NIST SRM-3133 (n=6) y SD obtenidos a un nivel de concentración de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg con dos conjuntos de parámetros de adquisición de datos diferentes: Método 1 (tiempo de integración de 4,194 s, 5 bloques y 1 ciclo) y Método 2 (tiempo de integración de 2,097 s, 1 bloque y 100 ciclos).

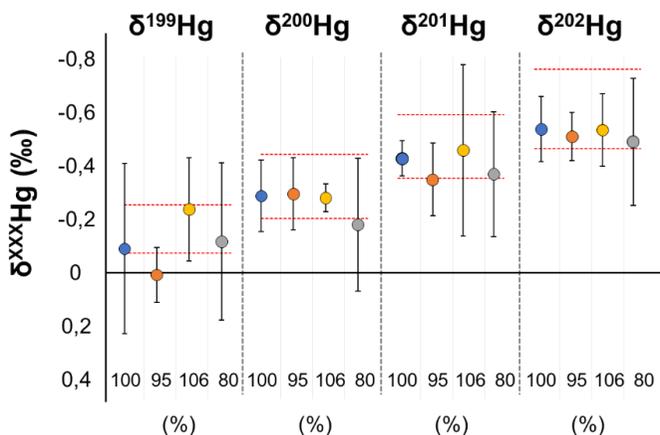
Método	$\delta^{199}\text{Hg}$	$\delta^{200}\text{Hg}$	$\delta^{201}\text{Hg}$	$\delta^{202}\text{Hg}$	$\frac{^{199}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}}$	$\frac{^{200}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}}$	$\frac{^{201}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}}$	$\frac{^{202}\text{Hg}}{^{198}\text{Hg}}$
IH <sup>95</sup>	Media	-0,14	-0,3	-0,45	-0,59	-	-	-
	SD	0,05	0,06	0,06	0,08	-	-	-
Método 1	Media	-0,13	-0,34	-0,44	-0,56	0,0028	0,0126	0,0037
	SD	0,03	0,05	0,04	0,03	0,0005	0,0012	0,0003
Método 2	Media	-0,1	-0,2	-0,36	-0,51	0,0029	0,0202	0,0046
	SD	0,05	0,07	0,05	0,06	0,0001	0,0015	0,0004

### D.5.4.3. Evaluación del nivel de concordancia entre las concentraciones de analitos de la muestra y de la disolución patrón

Para una correcta aplicación de la corrección externa de la discriminación de masas, es necesario asegurar que las intensidades de señal para la muestra y la disolución estándar externa no tengan un desajuste de más del 10%.<sup>225</sup> Para determinar hasta qué punto la coincidencia afecta a la precisión de las medidas de la relación isotópica de Hg a bajos niveles de concentración, se llevaron a cabo experimentos con distintos niveles de coincidencia de concentración entre el analito del patrón IH y las disoluciones SRM-3133 del NIST a un nivel de concentración de  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$  Hg, analizadas utilizando la configuración y los parámetros de adquisición de datos óptimos. En la **Figura 68** se observa que la peor precisión se obtiene cuando hay una discordancia del  $\pm 20\%$ . Las diferencias observadas cuando la concentración de Hg en el patrón externo coincide en un  $\pm 10\%$  con la de la muestra (es decir, la disolución patrón IH) pueden atribuirse a la variabilidad propia del equipo.

---

<sup>225</sup> 24. Yin, R., Krabbenhoft, D.P., Bergquist, B.A., Zheng, W., Lepak, R.F., Hurley, J.P., 2016. Effects of mercury and thallium concentrations on high precision determination of mercury isotopic composition by Neptune Plus multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 31, 2060–2068



**Figura 68.** Valores medios de los  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) del patrón IH ( $n=5$ ) obtenidos a diferentes grados de coincidencia de concentración de Hg entre la disolución patrón IH y la disolución patrón NIST SRM-3133 a un nivel de concentración de aproximadamente  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$  Hg. Las líneas rojas discontinuas representan la media  $\pm 2\text{SD}$  de los valores de IH obtenidos previamente<sup>95</sup>. Las barras de error corresponden a  $2\text{SD}$  y se obtuvieron a partir de  $n=5$  medidas CVG-MC-ICP-MS.

#### D.5.4.4. Evaluación de la precisión externa

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue desarrollar una metodología para determinar la composición isotópica de Hg en muestras con baja concentración de Hg. Después de seleccionar la configuración instrumental óptima (es decir, cuatro amplificadores de  $10^{13} \Omega$ , conos *jet* y condiciones de plasma seco) y los parámetros óptimos de adquisición de datos, se evaluaron los niveles de concentración a los que todavía se pueden obtener resultados fiables.

Se evaluaron la precisión y la precisión de los valores de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) ( $n=20$ ) del estándar IH a niveles de concentración de  $1,0$  a  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ . La **Tabla 47** muestra que los valores más altos de  $2\text{SD}$  se obtuvieron para el  $\delta^{200}\text{Hg}$ , especialmente a los niveles de concentración más bajos (es decir,  $0,25$  y  $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Esto puede atribuirse a que la monitorización del haz de iones de  $^{200}\text{Hg}$  se realiza utilizando una copa de Faraday conectada a un amplificador de  $10^{11} \Omega$ . Evidentemente, los valores de  $2\text{SD}$  aumentan a medida que disminuyen los niveles de concentración de Hg. Sin embargo, al nivel de concentración de  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$ , los valores de  $\delta^{xxx}\text{Hg}$

## Resultados

siguen siendo similares a los obtenidos a 0,50 y 1,0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Hg, así como a los recogidos en otro estudio<sup>95</sup> realizado a un nivel de concentración de 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  de Hg, yendo desde 0,13 a 0,27‰. Al nivel de concentración de 0,10  $\mu\text{g L}^{-1}$ , los valores de 2SD son inferiores a 0,50, lo que concuerda con resultados obtenidos a partir de señales transientes relativamente cortas durante el análisis isotópico de las especies específicas de Hg mediante GC-MC-ICP-MS<sup>226</sup>. Teniendo en cuenta la SD, se observó que los resultados medios de los valores  $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$  concordaban bien con los valores de referencia<sup>95</sup> a niveles de concentración de Hg tan bajos como 0,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

**Tabla 47.** Valores medios de  $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$  (‰) (n=20) y 2SD para el estándar IH a diferentes niveles de concentración de Hg.

	$\delta^{199}\text{Hg} \pm 2\text{SD}$	$\delta^{200}\text{Hg} \pm 2\text{SD}$	$\delta^{201}\text{Hg} \pm 2\text{SD}$	$\delta^{202}\text{Hg} \pm 2\text{SD}$
IH <sup>95</sup>	-0,14 $\pm$ 0,09	-0,30 $\pm$ 0,12	-0,45 $\pm$ 0,12	-0,59 $\pm$ 0,15
1,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	-0,12 $\pm$ 0,10	-0,25 $\pm$ 0,10	-0,41 $\pm$ 0,10	-0,54 $\pm$ 0,09
0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$	-0,10 $\pm$ 0,12	-0,22 $\pm$ 0,16	-0,37 $\pm$ 0,13	-0,47 $\pm$ 0,14
0,25 $\mu\text{g L}^{-1}$	-0,11 $\pm$ 0,14	-0,20 $\pm$ 0,27	-0,39 $\pm$ 0,13	-0,50 $\pm$ 0,18
0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$	-0,09 $\pm$ 0,31	-0,17 $\pm$ 0,49	-0,34 $\pm$ 0,31	-0,54 $\pm$ 0,34

### D.5.4.5. Análisis isotópico del Hg en muestras con baja concentración de Hg

Se recolectaron tres muestras de agua de 50 mL de distintas fuentes de una zona altamente industrializada de Gijón, Asturias, España. Estas fuentes, conocidas como La Parra (A1), La Piquera (A2) y El Muselín (A3), se encuentran

<sup>226</sup> Queipo-Abad, S., Rodríguez-González, P., García Alonso, J.I., 2019. Measurement of compound-specific Hg isotopic composition in narrow transient signals by gas chromatography coupled to multicollector ICP-MS. J. Anal. At. Spectrom. 34, 753–763

dentro de un radio de 750 metros. Debido a la presencia de metales pesados y a cuestiones de seguridad, estas fuentes de agua han sido canceladas la empresa local de aguas de Gijón. La cuantificación de la concentración total de Hg en las muestras se determinó utilizando un ICP-MS/MS por medio de calibración externa utilizando Tl como patrón interno. Se obtuvieron concentraciones de Hg de aproximadamente  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  para A1,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  para A2 y  $6 \mu\text{g L}^{-1}$  para A3. Como prueba de concepto, las muestras se diluyeron posteriormente para obtener disoluciones de concentraciones de  $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg. La determinación de la composición isotópica del Hg se llevó a cabo utilizando la configuración instrumental y los parámetros de adquisición óptimos, es decir, con conos de *jet*, condiciones de plasma seco y los cuatro amplificadores de  $10^{13} \Omega$  disponibles. Los valores  $\delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$  (‰) y  $\Delta^{\text{xxx}}\text{Hg}$  (‰) obtenidos para cada muestra se encuentran recogidos en la **Tabla 48**. En general, se obtuvieron valores de 2SD más altos para el  $\delta^{200}\text{Hg}$ , lo que concuerda con la tendencia observada a lo largo de los resultados de este capítulo. A pesar de la proximidad geográfica de las fuentes, se encontraron diferencias significativas; especialmente para los valores de la primera fuente de agua (A1) que fueron notablemente más bajos que los de las otras dos fuentes. Los valores  $\delta^{202}\text{Hg}$  (‰) y  $\Delta^{199}\text{Hg}$  (‰) obtenidos para las tres fuentes de agua están en concordancia con los valores para aguas superficiales antropogénicas que contienen Hg de fuentes mixtas, según se recoge en una revisión realizada por Blum, Sherman y Johnson<sup>39</sup>. Basándonos en los valores delta de las tres fuentes de agua, podríamos hipotetizar que la contaminación por Hg en las muestras de agua de A2 (La Piquera) y A3 (El Muselín) tiene el mismo origen, mientras que en el caso de las muestras de agua de A1 (La Parra), sería distinto. El conocimiento exacto del origen del Hg que contamina las fuentes de agua podría resolver el problema para convertirlas de nuevo en seguras para el consumo humano.

## Resultados

**Tabla 48.** Composición isotópica del Hg en muestras reales de agua superficial (concentraciones de Hg de aproximadamente 0,25 µg L<sup>-1</sup>).

Fuente de agua	$\delta^{199}\text{Hg}$	$\delta^{200}\text{Hg}$	$\delta^{201}\text{Hg}$	$\delta^{202}\text{Hg}$	$\Delta^{199}\text{Hg}$	$\Delta^{201}\text{Hg}$
A 1.1.	-0,53	-0,81	-1,30	-1,43	-0,16	-0,22
A 1.2.	-0,52	-0,74	-1,24	-1,42	-0,16	-0,18
A 1.3.	-0,46	-0,63	-1,35	-1,39	-0,11	-0,30
Media	-0,50	-0,72	-1,30	-1,42	-0,14	-0,23
2SD	0,07	0,18	0,11	0,04	0,06	0,13
A 2.1.	-0,20	-0,16	-0,42	-0,51	-0,07	-0,04
A 2.2.	-0,20	-0,13	-0,47	-0,53	-0,06	-0,07
A 2.3.	-0,23	-0,25	-0,49	-0,58	-0,08	-0,05
Media	-0,21	-0,18	-0,46	-0,54	-0,07	-0,05
2SD	0,03	0,12	0,07	0,07	0,02	0,04
A 3.1.	-0,33	-0,01	-0,52	-0,66	-0,16	-0,03
A 3.2.	-0,33	-0,16	-0,44	-0,60	-0,18	0,01
A 3.3.	-0,32	-0,23	-0,68	-0,66	-0,15	-0,19
Media	-0,33	-0,14	-0,55	-0,64	-0,16	-0,07
2SD	0,02	0,22	0,24	0,06	0,03	0,21

### D.5.5. Conclusiones

En este capítulo, se llevó a cabo una comparación de las capacidades y las limitaciones de diferentes configuraciones instrumentales y de los parámetros de adquisición de datos para la determinación de las relaciones isotópicas del Hg a niveles de concentración de Hg de hasta 0,10 µg L<sup>-1</sup>.

La evaluación abarcó la valoración de dos configuraciones de conos (estándar y *jet*), dos condiciones de plasma (húmedo y seco) y dos tipos de amplificadores de las copas de Faraday (10<sup>11</sup> Ω y 10<sup>13</sup> Ω). La combinación de dos tipos amplificadores diferentes para la recolección de los isótopos <sup>xxx</sup>Hg y <sup>198</sup>Hg dio lugar a las peores precisiones internas. El efecto de la corrección tau resultó ser

insignificante. Los resultados más favorables a los niveles de concentración más bajos se consiguieron mediante el uso de los conos *jet*, condiciones de plasma seco y el uso de los cuatro amplificadores de  $10^{13} \Omega$  disponibles. Esta configuración ofreció unos valores de precisión y exactitud al nivel de concentración de  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg similares a los valores publicados por un estudio previo<sup>95</sup> a una concentración muy superior de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg. Al nivel de concentración de  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , las desviaciones estándar aún se encontraban dentro del rango aceptable para las medidas de las relaciones isotópicas de Hg en señales transientes<sup>226</sup>.

Como prueba de concepto, el método desarrollado se utilizó para la determinación de la composición isotópica de Hg en muestras reales de agua, diluidas a un nivel de concentración de  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg. Los valores de 2SD obtenidos fueron comparables a los logrados a concentraciones más altas, destacándose así la fiabilidad del método y su aplicabilidad a muestras con baja concentración de Hg.



## **E. CONCLUSIONES GENERALES**



---

## E.1. Conclusiones generales

La presente Tesis Doctoral se ha enfocado en la especiación y el fraccionamiento isotópico de mercurio en muestras biológicas. A lo largo del manuscrito se han incluido las conclusiones específicas en los diversos capítulos, por lo que en esta sección se resumen las conclusiones generales del trabajo:

- Se compararon tres técnicas de espectrometría de masas (GC-ICP-MS, GC-(EI)-MS y GC-(EI)-MS/MS), en combinación con IDMS, para la determinación de MeHg, EtHg y Hg(II), utilizando diversos materiales de referencia certificados. GC-ICP-MS resultó ser superior a las otras dos técnicas, en términos de precisión, exactitud, límites de detección y tolerancia a la matriz, aunque GC-(EI)-MS (en modo SIM) podría ser también una buena alternativa para la determinación de las especies de Hg, siempre que no se analicen matrices tan complejas como la sangre. GC-(EI)-MS/MS se reveló como la peor de las tres opciones.
- Se determinó la concentración de MeHg, Hg(II) y HgT en muestras de pelo de individuos de Colombia afectados por la MAPE y en un material de referencia de cabello humano proporcionado por el NIES de Japón, por medio de ID-GC-ICP-MS. Los valores de concentración de MeHg y Hg(II) más altos para las muestras de cabello de individuos colombianos se obtuvieron para la región amazónica de Vaupés, mientras que para el resto de los departamentos se obtuvieron valores mucho más bajos, entre los que no se encontraron diferencias significativas. Los datos recopilados en este trabajo contribuyeron a la ampliación de la información sobre las comunidades colombianas afectadas por la MAPE y apuntan hacia la viabilidad del uso de ID-GC-ICP-MS para la determinación de Hg(II) como indicador eficaz de la absorción de Hg(II) por exposición directa a vapores de mercurio, a condición de que se descarte una posible desmetilación del MeHg en el organismo, haciendo uso del análisis del fraccionamiento isotópico.
- Se compararon diversos procedimientos de corrección del fenómeno de la discriminación de masas para la medida de la composición isotópica específica

## Conclusiones generales

---

de las especies de Hg por GC-MC-ICP-MS. En varias sesiones de medida se analizó el estándar de referencia primario NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133 y el estándar de referencia secundario NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133 y los datos se corrigieron aplicando dos modelos de corrección interna (Russell y Baxter) y dos procedimientos de corrección externa (SSB y el modelo de Baxter). Se observó que la precisión y la exactitud de los valores  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) fue ligeramente superior cuando se aplicó el cálculo por LRS en combinación con Russell y SSB.

- Se elaboró una metodología para la corrección interna de la discriminación de masas con un doble trazador de Hg(II) para la medida de la composición isotópica específica de las especies de Hg por GC-MC-ICP-MS. Se caracterizó un doble trazador de  $^{199}\text{Hg(II)}$  y  $^{201}\text{Hg(II)}$  y en varias sesiones de medida se analizó el estándar de referencia primario NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133 y el estándar de referencia secundario NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133 por CG-MC-ICP-MS, aplicando diversos modos de inyección en el GC (*Hot Splitless*, *Cold Splitless* y PTV) y condiciones de plasma húmedo y seco. Los datos se corrigieron aplicando dos métodos de corrección interna (TI y DS) y un procedimiento de corrección externa (SSB), siendo algo mejor la combinación DS y SSB con presencia de fraccionamiento isotópico inducido en el inyector.

- Se amplió el rango de aplicación del análisis isotópico de Hg utilizando CVG-MC-ICP-MS hasta concentraciones por debajo del  $\mu\text{g L}^{-1}$  mediante el uso de amplificadores de copas Faraday de  $10^{13} \Omega$ . En varias sesiones de medida se analizó el estándar secundario *In-house* vs. NIST SRM-3133 mediante CVG-MC-ICP-MS, con dos configuraciones de conos (estándar y *jet*), dos condiciones de plasma (seco y húmedo) y tres configuraciones de amplificadores diferentes (combinando los amplificadores tradicionales de  $10^{11} \Omega$  con los de  $10^{13} \Omega$ ). Combinando los conos *jet*, las condiciones de plasma seco y utilizando los cuatro amplificadores de  $10^{13} \Omega$  disponibles se obtuvieron valores de precisión y

---

exactitud al nivel de concentración de  $0,25 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg para los  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) similares a los valores publicados por un estudio previo<sup>95</sup> a una concentración de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de Hg.

### E.2. Overall conclusions

The present Doctoral Thesis was focused on the speciation and isotopic fractionation of mercury in biological samples. Throughout the manuscript, specific conclusions have been included in the various chapters, so this section summarizes the general conclusions of the work:

- Three mass spectrometry techniques (GC-ICP-MS, GC-(EI)-MS, and GC-(EI)-MS/MS), in combination with IDA, were compared for the determination of MeHg, EtHg, and Hg(II), using various certified reference materials. GC-ICP-MS proved to be superior to the other two techniques, in terms of precision, accuracy, detection limits, and matrix tolerance, although GC-(EI)-MS (in SIM mode) could also be a good alternative for the determination of Hg species, as long as matrices as complex as blood are not analysed. GC-(EI)-MS/MS turned out to be the worst of the three options.
- The concentration of MeHg, Hg(II), and THg in hair samples from individuals affected by ASGM in Colombia and in a human hair reference material provided by the NIES of Japan was determined using ID-GC-ICP-MS. The highest MeHg and Hg(II) concentration values for hair samples from Colombian individuals were obtained for the Amazonian region of Vaupés, while significantly lower values were obtained for other departments, showing no significant differences. The data collected in this work contributed to expanding information about Colombian communities affected by ASGM and indicate the viability of using ID-GC-ICP-MS for determining Hg(II) as an effective indicator of Hg(II) absorption through direct exposure to mercury vapors, on condition that possible demethylation of MeHg in the body is excluded by using isotopic fractionation analysis.
- Several mass bias correction procedures were compared for the measurement of the species-specific isotope composition of Hg by GC-MC-ICP-MS. The primary reference standard NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133 and the secondary reference standard NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133 were analysed

---

in several measurement sessions and the data were corrected by applying two internal correction models (Russell and Baxter) and two external correction procedures (SSB and the Baxter model). It was observed that the precision and accuracy of the  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) values were slightly better when applying the calculation by LRS in combination with Russell and SSB.

- A methodology for the internal correction of mass bias effect using a double Hg(II) tracer was developed for the measurement of the specific isotopic composition of Hg species by GC-MC-ICP-MS. A double tracer of  $^{199}\text{Hg(II)}$  and  $^{201}\text{Hg(II)}$  was characterized, and in several measurement sessions the primary reference standard NIST SRM-3133 vs. NIST SRM-3133 and the secondary reference standard NIST RM-8610 vs. NIST SRM-3133 were analysed by GC-MC-ICP-MS, applying different GC injection modes (Hot Splitless, Cold Splitless and PTV) and wet and dry plasma conditions. The data were corrected by applying two internal correction methods (TI and DS) and an external correction procedure (SSB), with the DS and SSB combination showing slightly better performance in the presence of induced isotopic fractionation in the injector.

- The application range of Hg isotopic analysis using CVG-MC-ICP-MS was extended to concentrations below  $\mu\text{g L}^{-1}$  by using Faraday cup amplifiers of  $10^{13}$   $\Omega$ . In several measurement sessions, the In-house secondary standard vs. NIST SRM-3133 was analysed using CVG-MC-ICP-MS, with two cone configurations (standard and jet), two plasma conditions (dry and wet) and three different amplifier configurations (combining the traditional  $10^{11}$   $\Omega$  amplifiers with the  $10^{13}$   $\Omega$  amplifiers). By combining the jet cones, the dry plasma conditions and using the four available  $10^{13}$   $\Omega$  amplifiers, precision and accuracy values were obtained at a concentration level of  $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$  Hg for the  $\delta^{xxx}\text{Hg}$  (‰) similar to the values published by a previous study<sup>95</sup> at a concentration of  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  Hg.



## **F. SUGERENCIAS PARA FUTUROS TRABAJOS**

---



## F.1. Sugerencias para futuros trabajos

Considerando los resultados obtenidos a lo largo de la presente Tesis Doctoral, se abre la puerta a posibles futuras investigaciones que permitirían la continuidad de la línea de investigación.

En el apartado **Resultados** del **segundo capítulo** se hizo notar la necesidad del estudio del fraccionamiento isotópico específico de las especies de Hg en muestras reales de pelo, para poder dilucidar el origen del Hg(II) en el cabello, pues este se asocia a dos posibles fuentes: la desmetilación de MeHg incorporado a través de la dieta o la adsorción del Hg gaseoso directamente desde la atmósfera.

Dado que no existe un patrón isotópico certificado para MeHg, para poder estudiar la composición isotópica del Hg(II) y del MeHg en muestras de cabello real sería necesario realizar tres experimentos independientes para cada una de las muestras.

Por un lado, se debería determinar la concentración de las especies de Hg, tal y como se llevó a cabo en el segundo capítulo, por medio de ID-GC-ICP-MS. Este experimento es necesario para la determinación del factor de desmetilación en la digestión básica de las muestras, por lo que es necesario aplicar la dilución isotópica con doble trazador ( $^{199}\text{Hg(II)}$  y  $^{201}\text{MeHg}$ ). Por tanto, se obtendrían así:  $C_{\text{Hg(II)}}$  (concentración de Hg(II) en  $\text{ng Hg g}^{-1}$ ),  $C_{\text{MeHg}}$  (concentración de MeHg  $\text{ng Hg g}^{-1}$ ), F (factor de desmetilación) y R (relación entre  $C_{\text{Hg(II)}}$  y  $C_{\text{MeHg}}$ ). Tanto las concentraciones de Hg(II) como las concentraciones de MeHg deberían expresarse en  $\text{ng Hg g}^{-1}$ . (**Experimento IDMS**).

Por otro lado, se debería determinar la composición isotópica del Hg(II) de las muestras de cabello aplicando la metodología del doble *spike* para la corrección interna de la discriminación de masas, desarrollada en el cuarto capítulo del apartado Resultados. Las muestras, una vez pesadas y marcadas con el doble

trazador ( $^{199}\text{Hg(II)}$  y  $^{201}\text{Hg(II)}$ ), serían digeridas en medio básico (del mismo modo que en el segundo capítulo), para la determinación de la composición isotópica del Hg(II) por medio de GC-MC-ICP-MS. De esta manera se obtendría la composición isotópica del Hg(II) contaminada por una pequeña fracción de MeHg desmetilado. (**Experimento I**).

Por último, debería determinarse la composición isotópica del mercurio total. Las muestras, tras ser pesadas y marcadas con el doble trazador ( $^{199}\text{Hg(II)}$  y  $^{201}\text{Hg(II)}$ ), serían digeridas en medio ácido (de la misma manera que se hizo con el material de referencia proporcionado por el NIES de Japón en el segundo capítulo) para la oxidación de todo el MeHg a Hg(II). La composición isotópica del HgT se determinaría así a partir de la medida de la composición isotópica del Hg(II) por medio de GC-MC-ICP-MS. (**Experimento II**)

A partir de los **Experimentos IDMS, I y II** se pueden establecer los siguientes balances de masas:

$$N_{\text{HgT}}^{\text{I}} = N_{\text{HgT}}^{\text{Hg(II)}} + F \times N_{\text{HgT}}^{\text{MeHg}} \quad (58)$$

$$N_{\text{HgT}}^{\text{II}} = N_{\text{HgT}}^{\text{Hg(II)}} + N_{\text{HgT}}^{\text{MeHg}} \quad (59)$$

Asumiendo que el factor de desmetilación (F) es constante e independiente de cada isótopo, pueden establecerse también los siguientes balances de masas para cada uno de los isótopos  $^{\text{xxx}}\text{Hg}$ :

$$N_{\text{xxx}}^{\text{I}} = N_{\text{xxx}}^{\text{Hg(II)}} + F \times N_{\text{xxx}}^{\text{MeHg}} \quad (60)$$

$$N_{\text{xxx}}^{\text{II}} = N_{\text{xxx}}^{\text{Hg(II)}} + N_{\text{xxx}}^{\text{MeHg}} \quad (61)$$

Dividiendo la ecuación (60) entre la ecuación (58) y la ecuación (61) entre la ecuación (59) podrían obtenerse las abundancias isotópicas de los **Experimentos I y II**. Utilizando la relación entre  $C_{\text{Hg(II)}}$  y  $C_{\text{MeHg}}$  (R) para simplificar se obtienen las siguientes ecuaciones:

$$A_{xxx}^I = \frac{N_{xxx}^{Hg(II)} + F \times N_{xxx}^{MeHg}}{N_{HgT}^{Hg(II)} \times \left(1 + \frac{F}{R}\right)} \quad (62)$$

$$A_{xxx}^{II} = \frac{N_{xxx}^{Hg(II)} + N_{xxx}^{MeHg}}{N_{HgT}^{MeHg} \times (1 + R)} \quad (63)$$

Reorganizando las ecuaciones (62) y (63) y se obtienen las ecuaciones (64) y (65):

$$A_{xxx}^I = \frac{A_{xxx}^{Hg(II)}}{\left(1 + \frac{F}{R}\right)} + \frac{F \times N_{xxx}^{MeHg}}{N_{HgT}^{Hg(II)} \times \left(1 + \frac{F}{R}\right)} \quad (64)$$

$$A_{xxx}^{II} = \frac{N_{xxx}^{Hg(II)}}{N_{HgT}^{MeHg} (1 + R)} + \frac{A_{xxx}^{MeHg}}{(1 + R)} \quad (65)$$

Por último, utilizando de nuevo R para simplificar las ecuaciones:

$$A_{xxx}^I \times \left(1 + \frac{F}{R}\right) = A_{xxx}^{Hg(II)} + \frac{F}{R} \times A_{xxx}^{MeHg} \quad (66)$$

$$A_{xxx}^{II} \times (1 + R) = R \times A_{xxx}^{Hg(II)} + A_{xxx}^{MeHg} \quad (67)$$

Las ecuaciones (66) y (67) tienen como únicas incógnitas  $A_{xxx}^{Hg(II)}$  y  $A_{xxx}^{MeHg}$  por lo que, midiendo la composición isotópica del Hg(II) en los **Experimentos I y II** se podría calcular la composición isotópica del Hg(II) y del MeHg en la muestra, siempre y cuando se conozca el factor de desmetilación (F) y relación entre las concentraciones de Hg(II) y MeHg (R).



## **G. ANEXO I**

---



**Artículo Científico I**

**Título:** Comparison of GC-ICP-MS, GC-EI-MS and GC-EI-MS/MS for the determination of methylmercury, ethylmercury and inorganic mercury in biological samples by triple spike species-specific isotope dilution mass spectrometry

**Autores:** Laura Suárez-Criado, Silvia Queipo-Abad, Andrés Rodríguez-Cea, Pablo Rodríguez-González y J. Ignacio García Alonso

**Revista:** J. Anal. At. Spectrom., 2022, 37, 1462-1470

**DOI:** 10.1039/D2JA00086E

Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2022, **37**, 1462

## Comparison of GC-ICP-MS, GC-EI-MS and GC-EI-MS/MS for the determination of methylmercury, ethylmercury and inorganic mercury in biological samples by triple spike species-specific isotope dilution mass spectrometry†

Laura Suárez-Criado, Silvia Queipo-Abad, Andrés Rodríguez-Cea, Pablo Rodríguez-González \* and J. Ignacio García Alonso 

We present here the determination of Hg species in complicated matrices by three different mass spectrometric techniques coupled to gas chromatography to evaluate if ionization suppression or spectral interferences are limiting factors to provide accurate and precise determinations, particularly when using the electron ionization source. GC-ICP-MS, GC-EI-MS and GC-EI-MS/MS are compared for the determination of Hg(II), methylmercury and ethylmercury by triple spiking isotope dilution mass spectrometry in the certified matrix reference materials DOLT-4 (dogfish liver), IAEA-085 (human hair), IAEA-086 (human hair) and SRM-955c (caprine blood). The analytical figures of merit such as accuracy and precision and detection limits were compared. Overall, GC-ICP-MS has demonstrated its superiority in terms of accuracy, precision, detection limits and matrix tolerance while GC-EI-MS provided results in agreement with the certified values for hair and dogfish liver reference materials. GC-ICP-MS provided three times lower detection limits for Hg(II) and MeHg than GC-EI-MS and between 4 to 10 times lower than GC-EI-MS/MS. The analysis of more complicated matrices at lower concentration levels, such as caprine blood, has shown important limitations of molecular MS to provide accurate and precise determinations. The higher selectivity offered by GC-EI-MS/MS in the selective reaction monitoring mode does not result in improved analytical characteristics due to lower yield in the formation of in-cell product ions for propylated Hg species.

Received 14th March 2022  
Accepted 26th May 2022

DOI: 10.1039/d2ja00086e

rsc.li/jaas

## Introduction

The gold standard approach to determine Hg compounds in complex samples is the application of isotope dilution mass spectrometry (IDMS) using gas chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (GC-ICP-MS).<sup>1</sup> This strategy not only provides the high selectivity, sensitivity and matrix tolerance of ICP-MS,<sup>2–4</sup> but also the possibility of applying multiple spiking to correct for Hg species' interconversion throughout the sample preparation procedure.<sup>5,6</sup> Previous works have already demonstrated that multiple spiking is required to obtain accurate and precise results in Hg speciation analysis, as transformation reactions of Hg species have been found to strongly depend on the sample matrix, extraction protocol and derivatization.<sup>7</sup> The determination of Hg(II), MeHg and EtHg by triple spiking IDMS and GC-ICP-MS has been

already reported.<sup>7–9</sup> However, ICP-MS is mostly applied in a routine basis for total elemental analysis while the routine determination of organometallic compounds is usually performed by GC-MS with electron ionization (EI) due to its lower cost in terms of acquisition and maintenance.

The application of IDMS for Hg speciation using an EI source is more complex than using an ICP source, particularly when applying multiple spiking. We have previously demonstrated the applicability of a multiple spiking IDMS for Hg(II) and MeHg determination in fish reference materials using GC-EI-MS instrumentation<sup>10</sup> and for butyltin compounds using GC-EI-MS/MS instrumentation.<sup>11</sup> The comparison of GC-ICP-MS and GC-EI-MS for the determination of Hg(II) and MeHg by single spiking IDMS has been previously reported for the analysis of human blood,<sup>12</sup> fish<sup>13</sup> and gastropod<sup>14</sup> tissues. Similar precision and accuracy were found for both techniques, but GC-EI-MS was found to provide worse detection and quantification limits.

The aim of this work is the comparison of three different mass spectrometric techniques coupled to gas chromatography in the determination of Hg species in complicated matrices to evaluate if ionization suppression or spectral interferences are

Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, Julián Clavería, 8, 33006-Oviedo, Spain. E-mail: rodriguezpablo@uniovi.es

† Electronic supplementary information (ESI) available. See <https://doi.org/10.1039/d2ja00086e>

## Artículo Científico II

**Título:** Determination of methylmercury and inorganic mercury in human hair samples of individuals from Colombian gold mining regions by double spiking isotope dilution and GC-ICP-MS

**Autores:** Laura Suárez-Criado, Pablo Rodríguez-González, José Marrugo-Negrete, J. Ignacio García Alonso y Sergi Díez

**Revista:** Environmental Research, 2023, 231, 115970

**DOI:** 10.1016/j.envres.2023.115970



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envres](http://www.elsevier.com/locate/envres)

# Determination of methylmercury and inorganic mercury in human hair samples of individuals from Colombian gold mining regions by double spiking isotope dilution and GC-ICP-MS

Laura Suárez-Criado<sup>a</sup>, Pablo Rodríguez-González<sup>a</sup>, José Marrugo-Negrete<sup>b,\*,\*\*</sup>,  
J. Ignacio García Alonso<sup>a</sup>, Sergi Díez<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physical and Analytical Chemistry, University of Oviedo, C/ Julián Clavería, 8, 33006 Oviedo, Spain

<sup>b</sup> Universidad de Córdoba, Carrera 6 N° 77-305, Montería, Córdoba, Colombia

<sup>c</sup> Environmental Chemistry Department, Institute of Environmental Assessment and Water Research, IDAEA-CSIC, Jordi Girona18-26, 08034, Barcelona, Spain

## ARTICLE INFO

Handling Editor: Jose L Domingo

### Keywords:

Hg species-specific  
Fish consumption  
Miners  
Andean  
Amazonian  
Colombia

## ABSTRACT

With the aim to distinguish between routes of exposition to mercury (Hg) in artisanal and small-scale gold mining (ASGM) communities and to distinguish between Hg contamination sources, Hg species composition should be performed in human biomarkers. In this work, Hg species-specific determination were determined in human hair samples (N = 96), mostly non-directly occupied in ASGM tasks, from the six most relevant gold mining Colombian regions. Therefore, MeHg, Hg(II) and THg concentrations were simultaneously determined by double spiking species-specific isotope dilution mass spectrometry (IDMS) and GC-ICP-MS. Only 16.67% of participants were involved at some point in ASGM works and fish consumption ranged from 3 to 7 times/week, which is between medium and high intake levels. The median concentration of THg obtained from all samples is higher than the reference dose weekly acceptable of MeHg intake established by the EPA (1 ppm), whereas a 25% were more than 4 times higher than the WHO level (2.2 µg Hg g<sup>-1</sup>). Median THg value of individuals consuming fish 5–7 times per week was significantly higher (p < 0.05) than those of the other consuming groups (12.5 µg Hg g<sup>-1</sup>). Most of the samples presented a % of MeHg relative to THg higher than 80%. The average % of Hg(II)/THg was 11% and only 10 individuals presented a Hg(II) content over 30%. No significant differences (p > 0.05) were found when the amount of Hg(II) was compared between people involved in ASGM task and people not involved. Interestingly, significant differences among the evaluated groups were found when the percentage of the Hg (II)/THg ratio of these groups were compared. In fact, people involved in ASGM tasks showed 1.7 times higher Hg(II)/THg vs. inhabitants uninvolved. This suggest that Hg(II) determination by IDMS-GC-ICP-MS could be a good proxy for evaluating Hg(II) adsorption by direct exposure to mercury vapors onto hair.

## 1. Introduction

Mercury (Hg) is one of the most toxic metals which can be released to the environment by both natural and anthropogenic sources, the latter being the main source of emissions (Selin, 2009). In the 19th century, and intimately related to the industrialization (Esbri et al., 2015), Hg emissions started to increase, reaching Hg atmospheric concentrations four times higher than previous natural levels (Outridge et al., 2018). Emissions associated with artisanal and small-scale gold mining (ASGM) account for almost 38% of the total Hg release to the biosphere

(UN-Environment, 2018).

In the course of ASGM activities, an amalgam is formed by mixing Hg and gold. Then, the amalgam is heated to extract the trapped gold, releasing Hg vapors into the air and hence, exposing miners and inhabitants of neighboring areas (Telmer and Veiga, 2009; UNEP, 2013). Once Hg reaches aquatic systems, a small fraction is converted by bacteria to methylmercury (MeHg) at the water-sediment interface (Marrugo-Negrete et al., 2015). Then, MeHg is able to enter into the food chain (Outridge et al., 2018), biomagnifying and bioaccumulating (Fuentes-Gandara et al., 2018), thus, consumption of contaminated fish

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jmarrugo@correo.unicordoba.edu.co](mailto:jmarrugo@correo.unicordoba.edu.co) (J. Marrugo-Negrete), [sergi.diez@idaea.csic.es](mailto:sergi.diez@idaea.csic.es) (S. Díez).

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115970>

Received 6 February 2023; Received in revised form 11 April 2023; Accepted 20 April 2023

Available online 28 April 2023

0013-9351/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.



---