



**Programa de Doctorat en Ciències**

**Escola de Doctorat de la Universitat Jaume I**

# APLICACIÓN DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS EMERGENTES EN EL ÁMBITO DE LA SALUD PÚBLICA

Memòria presentada per María Isabel Beser Santos per a optar al grau de doctora per la Universitat Jaume I

Directors

María Isabel Beser  
Santos

Dr. Joaquim Beltrán  
Arandes

Dr. Vicent Yusà  
Pelechà

Castelló de la Plana, Juny 2019



## **Finançament Rebut**

Agències finançadores del projecte de recerca o dels recursos materials específics del grup de recerca

- Consellería d'Educació (Generalitat Valenciana) – GC/2015/008



*A Iván, porque  
parte es tuya.*

*A Estela y Emma, porque  
"Nunca el tiempo es perdido".*

*A mis padres, porque sin su  
ayuda hubiera sido imposible.*



## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera aprovechar estas líneas para agradecer a todas las personas que han contribuido al desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, Dr. Vicent Yusà Pelechà y Dr. Joaquim Beltrán Arandes, el tiempo y el esfuerzo invertido para llegar a ver finalizado este proyecto, y más especialmente, por su consideración aceptando y respetando mis tiempos de dedicación a la presente Tesis Doctoral. Agradecer en particular a Vicent, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto y por la experiencia adquirida en el LSPV.

Me gustaría agradecer, en segundo lugar, a mi familia, no solo por su apoyo, sino también por su esfuerzo para ver realizado este objetivo, especialmente a Iván, que junto con mi madre han sido los dos pilares de esta Tesis. A Iván, por su amor, comprensión y su incesante ánimo en los momentos de frustración, y en especial, porque a pesar de las ausencias sufridas, ha sido capaz de apoyarme incondicionalmente. A mis niñas, Estela y Emma, a las que adoro, y a las que espero que el tiempo invertido en esta Tesis les haya enseñado que es posible, con esfuerzo, llegar a la meta. A mis padres, Chimo e Isabel, los que sin entender muy bien el objetivo de este proyecto, han creído en mí. Y a mi hermanito Joaquín, que en algún momento se le ocurrió pensar que me iba a dejar algo por acabar. A mis cuñadas y cuñado, Mari Carmen, Noelia, Rafa y Tere, por estar siempre dispuestas y dispuesto a cuidar de mis hijas. Y, como no, mil gracias a Rafi, por su ayuda en el diseño de la Tesis y a Migue, por su ayuda con el inglés (ya verás que pronto pasarás por este momento).

Quiero también agradecer a mis amig@s, Mari Carmen, Lorena, Dani, Raqui, Jose, Juan Carlos y a toda Peña Opa, a todos ellos porque de un modo u otro han estado presentes durante todo el camino, a partir de ahora "ya he acabado, sí, podéis llamarme *doctora*". Y, especialmente a Patri, quien en los momentos clave me ha reforzado y animado a continuar.

Quisiera agradecer también, a mis chicas del laboratorio, a Lucía, por creer en mí y recordarme, bromeando, en cada uno de los momentos difíciles que soy "*miss resistencia*"; a Nuria, por su implacable apoyo; a Raquel, por escucharme y animarme; y a Mertxe, con la que siempre es un placer trabajar codo con codo. A todas vosotras, porque me habéis sufrido.

Agradecer también a mis compañeros del LSPV, en especial, a Eduard, Mari Cruz, Miguel Angel, Elvira, Carmen, Pepe Toni, Julia, Pablo, Antonio y Yovana, a todos ellos que constituyen la unidad de Contaminantes Orgánicos, de los que he aprendido y con los que he crecido personal y profesionalmente. Me gustaría agradecer también a Olga por su contribución en los inicios de este proyecto, y que sin ella, probablemente, no me habría decidido a comenzar. Y a Marta, por su comprensión y apoyo durante su etapa en el LSPV.

Quisiera recordar en estos momentos a Carmen, también a mi abuelo, que me han visto trabajar a deshoras. Y a Román, que me hubiera agotado a preguntas. Por que después de ver parte del camino recorrido no han podido verme conseguirlo.

*Mil gracias a todos.*



# ÍNDICE GENERAL

OBJETIVOS	3
-----------	---

## **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.**

---

1. SALUD PÚBLICA	
EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES	9
2. CONTAMINANTES EMERGENTES	17
2.1. SUSTANCIAS ALQUIL POLI- Y PERFLUORADAS (PFASs)	27
2.2. RETARDANTES DE LLAMA (FRs)	32
<i>RETARDANTES DE LLAMA BROMADOS: POLIBROMODIFENIL ÉTERES (PBDEs)</i>	33
2.3. COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS (OPs)	36
3. METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EMERGENTES	38
3.1. ETAPAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	38
3.2. TÉCNICAS INSTRUMENTALES	54
4. OPTIMIZACIÓN MULTIVARIANTE	64
5. BIBLIOGRAFÍA	66

---

## **CAPÍTULO 2. DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN LA FASE PARTICULADA DEL AIRE MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM.**

---

1. INTRODUCCIÓN	91
2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 1	95
<i>Determination of Per- and Polyfluorinated substances in airborne particulate matter by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>	
3. ARTÍCULO CIENTÍFICO 2	131
<i>Design of experiment approach for the optimization of polybrominated diphenyl ethers determination in fine airborne particulate matter by microwave-assisted extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>	
4. DISCUSIÓN	158
5. BIBLIOGRAFÍA	172

## **CAPÍTULO 3. UTILIZACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PFAS Y OPs EN LECHE MATERNA.**

---

1. INTRODUCCIÓN	179
2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 3	183
<i>Determination of 21 perfluoroalkyl substances and organophosphorus compounds in breast milk by Liquid Chromatography coupled to Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry</i>	
3. DISCUSIÓN	217
4. BIBLIOGRAFÍA	228

---

## **CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA EVALUACIÓN DEL RIESGO RELACIONADO CON LA EXPOSICIÓN A PBDES POR CONSUMO DE PESCADO.**

---

1. INTRODUCCIÓN	235
2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 4	239
<i>Probabilistic risk assessment of the exposure to polybrominated diphenyl ethers via fish and seafood consumption in the region of Valencia (Spain)</i>	
3. DISCUSIÓN	271
4. BIBLIOGRAFÍA	280

## **CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.**

---

CONCLUSIONES	285
--------------	-----



## ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

<b>ACN</b>	<i>Acetonitrile / Acetonitrilo</i>
<b>AG</b>	<i>Auxiliary gas / Gas auxiliar</i>
<b>APCI</b>	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation / Ionización química a presión atmosférica</i>
<b>APFO</b>	<i>Ammonium pentadecafluorooctanoate / Pentadecafluorooctanoato de amonio</i>
<b>APPI</b>	<i>Atmospheric Pressure Photoionisation / Fotoionización a presión atmosférica</i>
<b>ASE</b>	<i>Accelerated Solvent Extraction / Extracción acelerada con disolvente</i>
<b>BFRs</b>	<i>Brominated Flame Retardants / Retardantes de llama bromados</i>
<b>BMDs</b>	<i>Benchmark Doses / Dosis de referencia</i>
<b>BMDL<sub>10</sub></b>	<i>Benchmark Dose Lower confidence limit / Límite mínimo de confianza para la dosis de referencia</i>
<b>CCD</b>	<i>Central Composite Design / Diseño central compuesto</i>
<b>CDF</b>	<i>Cumulative Density Function / Función de densidad acumulada</i>
<b>CE</b>	<i>Collision Energy / Energía de colisión</i>
<b>CFRs</b>	<i>Chlorinated Flame Retardants / Retardantes de llama clorados</i>
<b>CT</b>	<i>Capillary Temperature / Temperatura del capilar</i>
<b>CV</b>	<i>Capillary Voltage / Voltaje del capilar</i>
<b>DAD</b>	<i>Diode Array Detector / Detector de barrido de diodos</i>
<b>DCM</b>	<i>Dichloromethane / Diclorometano</i>
<b>DoE</b>	<i>Design of Experiments / Diseño de experimentos</i>
<b>dSPE</b>	<i>Dispersive Solid Phase Extraction / Extracción en fase sólida dispersiva</i>
<b>EC / CE</b>	<i>European Commission / Comisión Europea</i>
<b>ECHA</b>	<i>European Chemicals Agency / Agencia europea de sustancias y preparados químicos</i>
<b>ECD</b>	<i>Electron Capture Detector / Detector de captura de electrones</i>

<b>ECNI</b>	<i>Electron Capture Negative Ionisation / Ionización de captura de electrones negativa</i>
<b>EFRs</b>	<i>Emerging Flame Retardants / Retardantes de llama emergentes</i>
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority / Autoridad europea de seguridad alimentaria</i>
<b>EI</b>	<i>Electron Ionisation / Ionización electrónica</i>
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency / Agencia de protección ambiental</i>
<b>ESI</b>	<i>Electrospray Ionisation / Ionización por electrospray</i>
<b>EU / UE</b>	<i>European Union / Unión Europea</i>
<b>FID</b>	<i>Flame Ionisation Detector / Detector de ionización de llama</i>
<b>FLD</b>	<i>Fluorescence Detector / Detector de fluorescencia</i>
<b>FLF</b>	<i>Freezed-Lipid Filtration / Filtración de lípidos congelados</i>
<b>FOSAs</b>	<i>N-alkyl F-octane sulfonamides / sulfonamidas de alquil-fluorooctano</i>
<b>FOSEs</b>	<i>N-alkyl F-octane sulfonamidoethanols / Sulfonamidoetanolos de alquil-fluorooctano</i>
<b>FPD</b>	<i>Flame Photometric Detector / Detector fotométrico de llama</i>
<b>FRs</b>	<i>Flame retardants / Retardantes de llama</i>
<b>FTAs</b>	<i>Fluorotelomer acrylates / Acrilatos de telómeros fluorados</i>
<b>FTOHs</b>	<i>Fluorotelomer alcohols / Alcoholes telomeros fluorados</i>
<b>FWHM</b>	<i>Full Width at Half Maximum / Anchura a media altura</i>
<b>GC</b>	<i>Gas Chromatography / Cromatografía de gases</i>
<b>GC-HRMS</b>	<i>Gas Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry / Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución</i>
<b>GC-ICP-MS</b>	<i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry with Inductively Coupled Plasma / Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente</i>

<b>GC-MS</b>	<i>Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry / Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas</i>
<b>GC-MS/MS</b>	<i>Gas Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry / Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem</i>
<b>GFF</b>	<i>Glass Fiber Filter / Filtro de fibra de vidrio</i>
<b>GPC</b>	<i>Gel Permeation Chromatography / Cromatografía de exclusión por tamaños</i>
<b>HBCDDs</b>	<i>Hexabromocyclododecanes / Hexabromociclododecanos</i>
<b>HBM4EU</b>	<i>Human Biomonitoring For Europe / Biomonitorización humana en Europa</i>
<b>HCD</b>	<i>High Collision Dissociation / Disociación de alta energía</i>
<b>HESI-II</b>	<i>Heater Electrospray Ionisation / Ionización por electrospray con calefacción</i>
<b>HFRs</b>	<i>Halogenated Flame Retardants / Retardantes de llama halogenados</i>
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography / Cromatografía líquida de alta eficacia</i>
<b>HRMS</b>	<i>High Resolution Mass Spectrometry / Espectrometría de masas de alta resolución</i>
<b>HT</b>	<i>Heater Temperature / Temperatura del calefactor</i>
<b>ILIS</b>	<i>Isotopically Labelled Internal Standard / Patrón interno marcado isotópicamente</i>
<b>iLOQ</b>	<i>Instrumental Limit Of Quantitation / Límite de cuantificación instrumental</i>
<b>IS</b>	<i>Internal Standard / Patrón interno</i>
<b>IT</b>	<i>Ion Trap / Trampa de iones</i>
<b>LB</b>	<i>Lower Bound / Límite inferior</i>
<b>LC</b>	<i>Liquid Chromatography / Cromatografía líquida</i>
<b>LC-HRMS</b>	<i>Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry / Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución</i>
<b>LC-MS</b>	<i>Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry / Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas</i>

<b>LC-MS/MS</b>	<i>Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry / Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem</i>
<b>LLE</b>	<i>Liquid-Liquid Extraction / Extracción líquido-líquido</i>
<b>LOD</b>	<i>Limit Of Detection / Límite de detección</i>
<b>LOQ</b>	<i>Limit Of Quantitation / Límite de cuantificación</i>
<b>LOR</b>	<i>Limit Of Reporting / Límite de comunicación</i>
<b>LVI</b>	<i>Large Volume Injection / Inyección de grandes volúmenes</i>
<b>m/z</b>	<i>Mass to charge Ratio / Relación masa-carga</i>
<b>MAE</b>	<i>Microwave Assited Extraction / Extracción asistida con microondas</i>
<b>ME</b>	<i>Matrix Effect / Efecto matriz</i>
<b>MeOH</b>	<i>Methanol / Metanol</i>
<b>MDL</b>	<i>Method Detection Limit / Límite de detección del método</i>
<b>MOE</b>	<i>Margin Of Exposure / Margen de exposición</i>
<b>MQL</b>	<i>Method Quantitation Limit / Límite de cuantificación del método</i>
<b>MRM</b>	<i>Multiple Reaction Monitoring / Monitorización de reacciones múltiples</i>
<b>MS</b>	<i>Mass spectrometry / Espectrometría de Masas</i>
<b>MS/MS</b>	<i>Tandem Mass Spectrometry / Espectrometría de masas en tándem</i>
<b>NBFRs</b>	<i>Novel Brominated Flame Retardants / Retardantes de llama bromados novedosos</i>
<b>NCI</b>	<i>Negative Chemical Ionisation / Ionización química negativa</i>
<b>NFRs</b>	<i>Novel Flame Retardants / Retardantes de llama novedosos</i>
<b>NPD</b>	<i>Nitrogen-Phosphorus Detector / Detector Nitrógeno-Fósforo (termoiónico)</i>
<b>OCPs</b>	<i>Organochlorine Pesticides / Pesticidas organoclorados</i>
<b>OHPs</b>	<i>Organohalogenated Pollutants / Contaminantes organohalogenados</i>
<b>OPs</b>	<i>Organophosphorous Compounds / Compuestos organofosforados</i>
<b>PAHs</b>	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons / Hidrocarburos aromáticos policíclicos</i>



<b>PB</b>	<i>Plackett-Burman</i>
<b>PBDEs</b>	<i>Polybrominated Diphenyl Ethers / Polibromodifenil éteres</i>
<b>PCBs</b>	<i>Polychlorinated Biphenyls / Bifenilos policlorados</i>
<b>PCDD/Fs</b>	<i>Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins and Dibenzofurans / Policlorodibenzodioxinas y policlorodibenzofuranos</i>
<b>PCI</b>	<i>Positive Chemical Ionisation / Ionización química positiva</i>
<b>PDF</b>	<i>Probability Density Function / Función de densidad de probabilidad</i>
<b>PFAAs</b>	<i>Perfluoroalkyl Acids / Ácidos alquil perfluorados</i>
<b>PFAS</b>	<i>Perfluoroalkyl Substances / Sustancias alquil perfluoradas</i>
<b>PFASs</b>	<i>Per- and Polyfluorinated Substances / Sustancias alquil per- y polifluoradas</i>
<b>PFBA</b>	<i>Perfluorobutanoic Acid / Ácido perfluorobutanoico</i>
<b>PFCAs</b>	<i>Perfluorinated Carboxylic Acids / Ácidos carboxílicos alquil perfluorados</i>
<b>PFOA</b>	<i>Perfluorooctanoic Acid / Ácido perfluorooctanoico</i>
<b>PFOS</b>	<i>Perfluoro-1-Octanesulfonate / Sulfonato de perfluorooctano</i>
<b>PFRs</b>	<i>Phosphorous Flame Retardants / Retardantes de llama fosforados</i>
<b>PFSA</b> s	<i>Perfluoroalkane Sulfonates / Sulfonatos de perfluoroalcano</i>
<b>PLE</b>	<i>Pressurized Liquid Extraction / Extracción con disolvente presurizado</i>
<b>PM10</b>	<i>Particulate Matter with diameter smaller than 10 <math>\mu\text{m}</math> / Materia particulada de diámetro inferior a 10 <math>\mu\text{m}</math></i>
<b>PM2.5</b>	<i>Particulate Matter with diameter smaller than 2.5 <math>\mu\text{m}</math> / Materia Particulada de diámetro inferior a 2.5 <math>\mu\text{m}</math></i>
<b>POPs / COPs</b>	<i>Persistent Organic Pollutants / Contaminantes Orgánicos Persistentes</i>
<b>POSF</b>	<i>Perfluorooctanesulfonyl fluoride / Fluoruro de perfluorooctano sulfonilo</i>
<b>PTV</b>	<i>Programmable Temperature Vaporization / Vaporización de temperatura programable</i>
<b>Q</b>	<i>Quadrupole / Cuadrupolo</i>
<b>QFF</b>	<i>Quartz Fiber Filter / Filtro de fibra de cuarzo</i>

<b>QqQ</b>	<i>Triple Quadrupole</i> / Triple cuadrupolo
<b>QTOF</b>	<i>Quadrupole-Time-Of-Flight</i> / Cuadrupolo-tiempo de vuelo
<b>QuEChERS</b>	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> / Rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro
<b>RA</b>	<i>Risk Assessment</i> / Análisis del riesgo
<b>REACH</b>	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemical substances</i> / Registro, evaluación, autorización y restricción de sustancias y preparados químicos
<b>RSD</b>	<i>Relative Standard Deviation</i> / Desviación estándar relativa
<b>RRT</b>	<i>Relative Retention Time</i> / Tiempo de retención relativo
<b>S/N</b>	<i>Signal to Noise ratio</i> / Relación señal-ruido
<b>SGP</b>	<i>Sheath Gas Pressure</i> / Presión del gas envolvente
<b>SIM</b>	<i>Selected Ion Monitoring</i> / Monitorización selectiva de iones
<b>SKV</b>	<i>Skimmer Voltage</i> / Voltaje del skimmer
<b>SLE</b>	<i>Solid-Liquid Extraction</i> / Extracción sólido-líquido
<b>SPE</b>	<i>Solid Phase Extraction</i> / Extracción en fase sólida
<b>SPME</b>	<i>Solid Phase Micro-extraction</i> / Micro-extracción en fase sólida
<b>SRM</b>	<i>Selected Reaction Monitoring</i> / Monitorización selectiva de transiciones
<b>SV</b>	<i>Spray Voltage</i> / Voltaje de espray
<b>SVHC</b>	<i>Substances of Very High Concern</i> / Sustancias altamente preocupantes
<b>TBBPA</b>	<i>Tetrabromobisphenol A</i> / Tetrabromobisfenol A
<b>TCEP</b>	<i>Tris(2-chloroethyl) Phosphate</i> / Tris(2-cloroetil) fosfato
<b>TDI / IDA</b>	<i>Tolerable Daily Intake</i> / Ingesta Diaria Admisible
<b>TEHP</b>	<i>Tris(2-ethylhexyl)phosphate</i> / Tris(2-etilhexil) fosfato
<b>TMP</b>	<i>Trimethyl Phosphate</i> / Trimetil fosfato
<b>TnBP</b>	<i>Tri-n-butyl Phosphate</i> / Tri-n-butil fosfato
<b>TOF</b>	<i>Time Of Flight</i> / Tiempo de vuelo
<b>TPhP</b>	<i>Triphenyl Phosphate</i> / Trifenil fosfato
<b>UAE</b>	<i>Ultrasonic Assisted Extraction</i> / Extracción asistida con ultrasonidos
<b>UB</b>	<i>Upper Bound</i> / Límite superior

<b>UHPLC</b>	<i>Ultra-High Pressure Liquid Chromatography /</i> Cromatografía de ultra-alta presión
<b>UHPLC-HRMS</b>	<i>Ultra-High Pressure Liquid Chromatography coupled to</i> <i>High Resolution Mass Spectrometry /</i> Cromatografía de ultra-alta presión acoplada a espectrometría de masas de alta resolución
<b>UV</b>	<i>Ultraviolet Detector /</i> Detector ultravioleta
<b>vPvB</b>	<i>Very Persistent and very Bioaccumulative /</i> Muy persistente y muy bioacumulativo
<b>WWTP</b>	<i>Wastewater Treatment Plant /</i> Planta de tratamiento de aguas residuales
<b>WHO / OMS</b>	<i>World Health Organization /</i> Organización Mundial de la Salud





## *OBJETIVOS*



## OBJETIVOS

El **objetivo general** de esta tesis es el desarrollo de nuevas metodologías analíticas aprovechando los avances en el acoplamiento entre la cromatografía y la espectrometría de masas, con el fin de mejorar los aspectos cualitativos y cuantitativos de la determinación de contaminantes orgánicos emergentes en muestras de alimentos, biológicas y ambientales, para su utilización en el ámbito de la salud pública, y específicamente en el control de la cadena alimentaria y en la evaluación de la exposición humana, externa e interna, a los contaminantes orgánicos.

Para poder llevar a cabo el objetivo general de esta tesis, ha sido necesario alcanzar los siguientes **objetivos específicos**:

1. Desarrollar, optimizar y validar un método analítico para la determinación de sustancias alquil perfluoradas (PFAS) en la fase particulada del aire mediante extracción asistida con microondas (MAE) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem.
2. Desarrollar, optimizar y validar un método analítico para la determinación de polibromodifenil éteres (PBDEs) en la fase particulada del aire mediante extracción asistida con microondas (MAE) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem.
3. Determinación de sustancias alquil perfluoradas (PFAS) y compuestos organofosforados (OPs) en leche materna mediante el uso de la espectrometría de masas de alta resolución.
4. Analizar y calcular la ingesta de PBDEs resultante del consumo de pescado y productos de la pesca, así como evaluar el riesgo de estos contaminantes en la dieta en la Comunidad Valenciana.







***CAPÍTULO 1***  
***INTRODUCCIÓN GENERAL***



# **CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.**

---

1. <u>SALUD PÚBLICA</u>	
EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A CONTAMINANTES	9
2. <u>CONTAMINANTES EMERGENTES</u>	17
2.1. SUSTANCIAS ALQUIL POLI- Y PERFLUORADAS (PFAS)	27
2.2. RETARDANTES DE LLAMA (FRs)	32
<i>RETARDANTES DE LLAMA BROMADOS: POLIBROMODIFENIL ÉTERES (PBDEs)</i>	33
2.3. COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS (OPs)	36
3. <u>METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EMERGENTES</u>	38
3.1. ETAPAS DE EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN	38
3.2. TÉCNICAS INSTRUMENTALES	54
4. <u>OPTIMIZACIÓN MULTIVARIANTE</u>	64
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	66

---



## **1. SALUD PÚBLICA: EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN HUMANA A CONTAMINANTES**

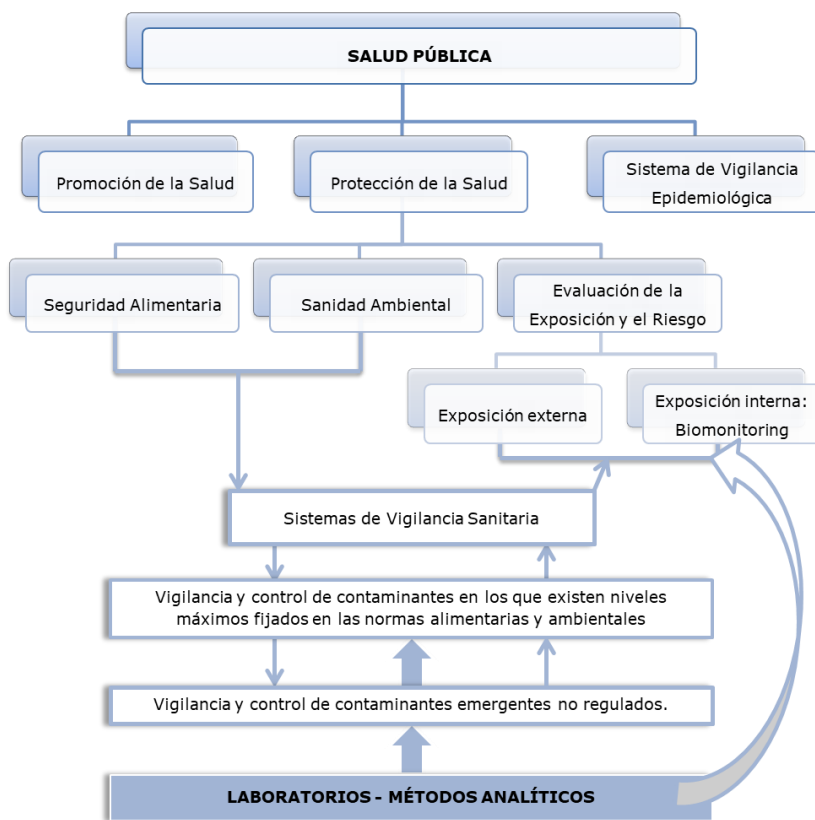
El medio ambiente es un importante determinante de la salud humana. La exposición a sustancias químicas con una toxicidad intrínseca, tales como las cancerígenas, mutagénicas o disruptores endocrinos, suponen un relevante problema de salud pública (Vrijheid et al. 2016; Fernández-Navarro et al. 2017). En las últimas décadas, con el crecimiento constante de la producción y el uso de productos químicos, se han visto incrementados los problemas de salud de la población vinculados a la exposición a estas sustancias químicas (Gavrilescu et al. 2015; The Lancet Comissions 2018).

Una de las actividades más relevantes de salud pública, impulsada por los organismos nacionales e internacionales, es la protección de la salud frente a la exposición a las sustancias químicas potencialmente presentes en el medio ambiente. El establecimiento de sistemas adecuados de vigilancia de la contaminación química de los distintos medios (suelo, agua, aire y alimentos), a través de los cuales puede vehiculizarse la exposición humana a los contaminantes ambientales, es esencial para garantizar la protección de la salud.

En el campo de los contaminantes ambientales, la vigilancia y el control se ejercen en dos ámbitos complementarios, a) el de los contaminantes prioritarios y b) el de los contaminantes emergentes. Los contaminantes prioritarios son aquellos ampliamente conocidos que tienen una regulación específica, y para los cuales se han fijado niveles críticos o límites máximos. Un ejemplo paradigmático de este grupo de sustancias son los denominados contaminantes orgánicos persistentes (POPs) regulados por el Convenio de Estocolmo, entre los que destacan los bifenilos policlorados (PCBs), las dioxinas o los plaguicidas organoclorados (Fernández-Cruz et al. 2017), también pueden incluirse en este grupo otros plaguicidas utilizados habitualmente en la agricultura, los residuos de medicamentos veterinarios o los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), todos ellos regulados por distintas normas como el reglamento (CE) No 396/2005, el reglamento (UE) No 37/2010 y el reglamento (CE) No 1881/2006 (Reglamento (CE) No 396/2005 del Parlamento y del Consejo Europeo; Reglamento (UE) No 37/2010 de la Comisión; Reglamento (CE) No 1881/2006 de la Comisión).

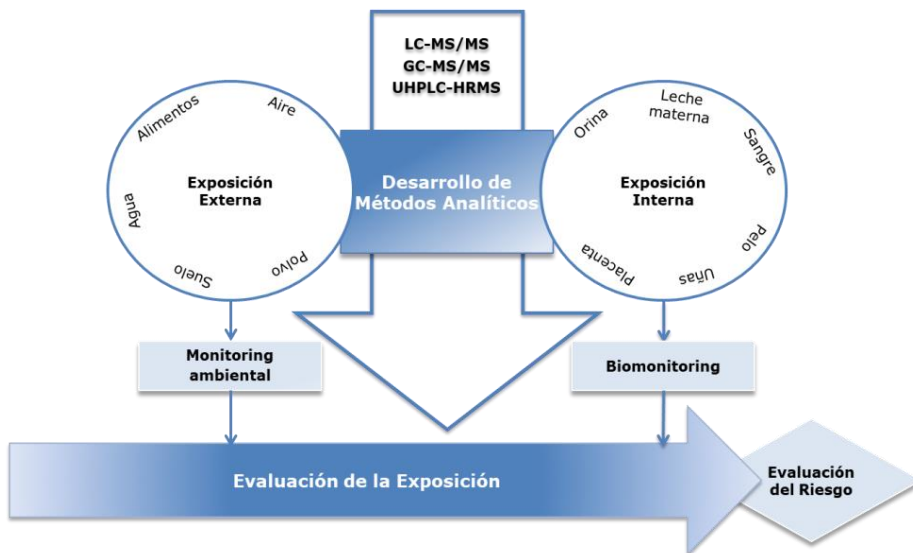
Los contaminantes emergentes, por el contrario, no están regulados, aunque se tienen indicios de su toxicidad y de su presencia en el medio ambiente, por lo que se requiere información sobre sus niveles en los distintos medios (agua, alimentos, aire,...) para evaluar su posible regulación (EFSA 2012a).

Uno de los objetivos de los sistemas de vigilancia y control de los contaminantes ambientales, además de verificar el cumplimiento de las normas y legislaciones sobre niveles máximos, es posibilitar el estudio de la evaluación de la exposición a los mismos, a través de distintos enfoques como la monitorización ambiental (exposición externa) o el biomonitoring (exposición interna). Todas estas actividades de control y vigilancia de los contaminantes orgánicos ambientales no pueden llevarse a cabo sin el adecuado soporte analítico que deben proporcionar los laboratorios de salud pública (**Figura 1**).



**Figura 1.** Relación entre Salud Pública y el desarrollo de métodos analíticos.

En los últimos años se ha realizado un enorme esfuerzo de investigación dedicado a evaluar la exposición humana a los contaminantes prioritarios y emergentes, particularmente a aquellos que están presentes en varias esferas del medio ambiente (atmósfera, hidrosfera, biosfera, litosfera). Esta evaluación sólo puede realizarse sobre la base de disponer de las adecuadas capacidades analíticas que actualmente proporcionan los acoplamientos instrumentales de gran potencia como la cromatografía (gases/líquidos) con la espectrometría de masas (Lehotay et al. 2015; Megson et al. 2016) (**Figura 2**).



**Figura 2.** Relación entre el desarrollo de metodologías analíticas y la evaluación de la exposición.

Para mejorar la protección de la salud de los ciudadanos, es necesario conocer con precisión el impacto de los contaminantes medioambientales en la salud humana (Vargas 2005; Comisión de las Comunidades Europeas COM(2004)416 2004). Es fundamental en este ámbito considerar la realización de estudios de evaluación del riesgo (**Figura 2**).

El análisis del riesgo (RA) se ha consolidado como la metodología de referencia para, entre otros, evaluar el impacto de los contaminantes ambientales en la salud de la población y mejorar los sistemas de control. El RA ha sido definido por la comisión del Codex Alimentarius como un proceso, constituido por tres componentes: i) evaluación del riesgo, ii)

gestión del riesgo y iii) comunicación del riesgo (FAO/WHO 2006; Ize et al 2010). La **Figura 3** muestra los componentes del análisis del riesgo.



**Figura 3.** Componentes del análisis del riesgo.

La evaluación del riesgo es un proceso con fundamentos científicos, que comienza con la formulación del problema e incluye cuatro etapas: i) Identificación del peligro, identificación del agente químico capaz de causar efectos adversos sobre la salud; ii) Caracterización del peligro, evaluación cualitativa o cuantitativa de la naturaleza de los efectos adversos sobre la salud asociadas con los agentes químicos; iii) Estimación de la exposición, estimación de la cantidad y concentración de un agente particular que alcanza una población diana; y iv) Caracterización del riesgo, estimación cualitativa y/o cuantitativa, incluyendo las incertidumbres, de la probabilidad de la ocurrencia y la severidad de los conocidos o potenciales efectos adversos para la salud, en una población dada, basada en la identificación y caracterización del peligro y estimación de la exposición (Dorne et al. 2013).

La evaluación del riesgo es una de las actividades de mayor relevancia en el campo de la salud pública, que no solo demanda la atención y la dedicación coordinada de muchos laboratorios y agencias nacionales e internacionales de control, sino que requiere un importante esfuerzo de investigación conjunto en distintos campos como la toxicología, la Química Analítica, o la epidemiología. Es fundamental en los ámbitos de la salud humana, la seguridad alimentaria y la protección del medio ambiente (Van der Oost et al. 2003).



Mediante el conocimiento de las concentraciones de determinados contaminantes ambientales en los diferentes medios, como aire y alimentos, es posible evaluar la exposición de diferentes grupos poblacionales a dichos contaminantes, y por lo tanto, evaluar el riesgo asociado a su presencia.

Un ejemplo de ello son los estudios de Dieta Total, que permiten, a través de un conocimiento pormenorizado de la contaminación de los alimentos por diversos compuestos (Dioxinas, PCBs, PBDEs, ...), y de la dieta de una población concreta (cantidad de alimentos de cada tipo consumidos), estimar la ingesta de contaminantes para los distintos grupos de población realizando la posterior evaluación del riesgo y, cuando se considere oportuno, implantar las medidas destinadas a la reducción de dicha exposición (EFSA, FAO, and WHO 2011).

También la Comisión de la Unión Europea en el Plan de Acción europeo de medio ambiente y salud 2004-2010 (Comisión de las Comunidades Europeas COM(2004)416 2004), buscó una mejor comprensión de las relaciones existentes entre los factores ambientales y las enfermedades respiratorias, los trastornos del desarrollo neurológico, el cáncer y los alteradores endocrinos. Para ello, uno de sus objetivos previos era vigilar la exposición a través del medio ambiente, incluidos los alimentos, desarrollando un marco de vigilancia integrada de la exposición a los principales factores ambientales asociados a los problemas sanitarios, como son dioxinas y PCBs, metales pesados y alteradores endocrinos; realizando la evaluación del riesgo a partir de los datos obtenidos.

Resultado de todo ello es la implantación de medidas reguladoras para minimizar el riesgo, como por ejemplo, la Directiva 2008/50/EC del Parlamento Europeo y del Consejo del 21 de Mayo del 2008 en calidad del aire ambiente y una atmosfera más limpia en Europa (Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council 2008), la Directiva (UE) 2015/1480 en la que se establecen las normas relativas a los métodos de referencia, la validación de datos y la ubicación de los puntos de muestreo para la evaluación de la calidad del aire ambiente (Directiva (UE) 2015/1480 de la Comisión 2015), o el Reglamento sobre el registro, evaluación, autorización y restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH) (Reglamento (CE) No 1907/2006 del Parlamento y del Consejo Europeo 2006) que entró en vigor en 2007 con la consiguiente

recogida de información sobre sus propiedades toxicológicas, a través de la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (ECHA) (European Commission SEC(2010)387 2010).

Sin embargo, la presencia de sustancias químicas en las matrices medioambientales (agua, alimentos, aire, suelo, sedimento, etc.) no implica necesariamente una absorción por el organismo ni unos efectos adversos en la salud humana. Para una evaluación de la dosis de contaminantes realmente incorporada en humanos (dosis interna) y una evaluación más precisa del riesgo derivado de la presencia de contaminantes, es indispensable completar la vigilancia ambiental con la puesta en marcha de programas de monitorización biológica (biomonitorización) en humanos (Needham et al. 2007; European Commission SEC(2010)387 2010).

La biomonitorización en humanos es una herramienta de gran utilidad para la protección de la salud frente a la exposición a sustancias químicas, que a través de una actividad sistemática de recogida de muestras biológicas, el análisis de las concentraciones de los contaminantes y/o sus metabolitos u otros parámetros biológicos, y la comparación de los niveles observados con valores de referencia, puede permitir una mejor valoración de la exposición (exposición interna) y una más completa evaluación del riesgo (Barr et al. 2005). Los datos obtenidos en los estudios de biomonitorización proporcionan una medida integrada de la exposición de la población procedente del conjunto de todas las fuentes de contaminación y tiene en cuenta todas las rutas de exposición o de entrada al cuerpo humano (inhalación, ingestión y absorción dérmica).

Para la correcta aplicación de esta herramienta es indispensable seleccionar tanto la matriz biológica como los biomarcadores más adecuados para cada tipo de contaminante, así como disponer de métodos analíticos fiables, sensibles, aplicados bajo estrictos protocolos de calidad y disponer de referencias para la interpretación de los resultados (Angerer et al. 2007).

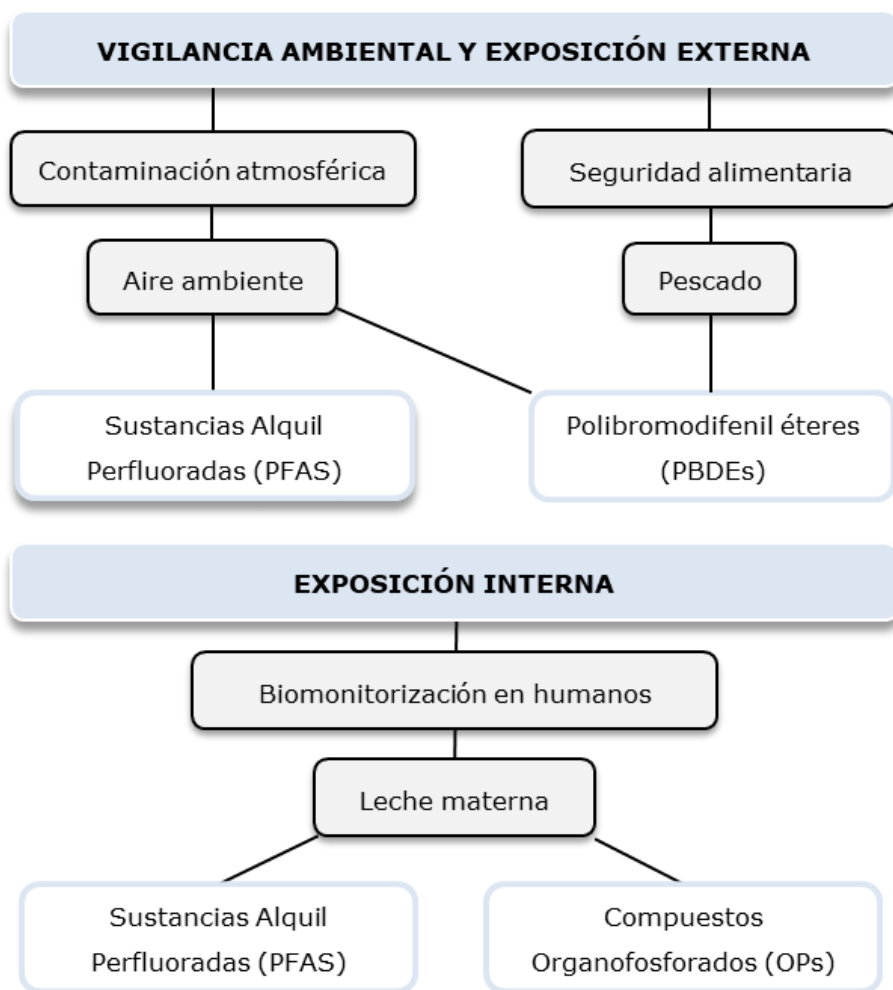
Las matrices biológicas más empleadas en los estudios de biomonitorización son la sangre (suero y plasma), la orina y la leche materna. La sangre es una matriz ideal para muchos contaminantes persistentes lipofílicos, como los pesticidas organoclorados (aldrin, dieldrin, clordano...), polibromodifenil éteres (PBDEs) o PCBs, ya que está en contacto con todos los tejidos y en equilibrio con los órganos donde se pueden depositar estos compuestos. Sin

embargo, la recolección de sangre es una técnica invasiva que puede condicionar la participación voluntaria de las personas en los estudios. Por otro lado, la orina se considera una matriz de extremo interés para el análisis de contaminantes no persistentes e hidrófilos que se excretan rápidamente como los metabolitos de los ftalatos (Fromme et al. 2007) o de los insecticidas piretroides (Couture et al. 2009; Yusa et al. 2015), ya que es relativamente fácil de recoger y no es invasiva. En cuanto a la leche materna, se considera matriz no invasiva, en la que, al igual que en la sangre, se acumulan los contaminantes lipofílicos, como son la mayoría de los POPs (pesticidas organoclorados, PBDEs, HBCDDs, PCBs,..) o algunos contaminantes emergentes (OPs, BFRs,...). Los estudios en leche materna son especialmente relevantes, ya que no solo aportan datos de la exposición de los recién nacidos, por ser su principal fuente de alimentación, sino que son indicadores de la exposición materna (Barr et al. 2005). El desarrollo de nuevas y potentes metodologías y técnicas analíticas está permitiendo el uso de otras matrices que son poco o nada invasivas como la saliva, pelo o uñas, aunque son necesarios más estudios para establecer correlaciones entre las concentraciones en las mismas y la carga total en el cuerpo (body burden) (Esteban 2009).

Sin duda la biomonitorización en humanos debe centrarse en la evaluación de las sustancias prioritarias y emergentes en el ámbito medioambiental, aunque la sustancia a investigar no sea necesariamente la sustancia inicial sino un biomarcador de exposición a la misma. La selección del biomarcador adecuado es de enorme relevancia en el diseño, viabilidad e interpretación de los resultados en los estudios de biomonitorización, ya que ha de ser lo más específico posible de la sustancia original estudiada y sus niveles en sangre u orina deben ser detectables con los métodos analíticos existentes. Los programas de biomonitorización y la mayoría de los estudios utilizan fundamentalmente biomarcadores de exposición entre los que se encuentran aquellos contaminantes o sus metabolitos de mayor interés en el ámbito medioambiental, tales como: metales, plaguicidas, PAHs, dioxinas, compuestos retardantes de llama, tanto bromados (BFRs) como fosforados (PFRs), sustancias alquil perfluoradas (PFAS) y ftalatos, entre otros.

En la presente **Tesis Doctoral** se aborda la puesta a punto de nuevas metodologías analíticas para la investigación de algunos grupos de

contaminantes en diversas matrices para la futura evaluación de la exposición tanto interna como externa (**Figura 4**). En relación a la exposición externa se han estudiado diferentes familias de contaminantes, PFAS y PBDEs en aire, y éstos últimos también en pescado. Por otro lado, respecto a la exposición interna se han realizado estudios para biomonitorización en leche materna de contaminantes poco estudiados hasta el momento en esta matriz, como son las PFAS y los compuestos organofosforados (OPs).



**Figura 4.** Matrices y sustancias estudiadas.

## 2. CONTAMINANTES EMERGENTES

Los contaminantes emergentes engloban una gran variedad de sustancias químicas elaboradas por el hombre (como pesticidas, sustancias retardantes de llama, parabenos, o sustancias alquil perfluoradas, entre otras), las cuales forman parte, incluso, de productos de uso común y generalizado como cosméticos, fármacos, mobiliario, plásticos, juguetes, etc. (Gavrilescu et al. 2015). Este conjunto de sustancias están continuamente introduciéndose en el medio ambiente debido a su amplio uso, y en general, todavía no existen legislaciones nacionales o internacionales que fijen sus niveles máximos en las distintas matrices ambientales. No tienen por qué ser nuevas, pero su destino en el medioambiente y sus características toxicológicas todavía no han sido evaluados, lo que está suscitando una enorme preocupación por su posible impacto negativo en la salud humana y en el medio ambiente. Obviamente, el desarrollo apropiado de las investigaciones recientes conlleva a que algunos de los contaminantes considerados emergentes dejen de serlo al incluirse en los programas de vigilancia e incluso en restricciones legales o reglamentarias (Reemtsma et al. 2008). Ejemplo de ello pueden ser algunas de las sustancias prioritarias ahora clasificadas como POPs, como por ejemplo, el sulfonato de perfluorooctano (PFOS) o algunos PBDEs, cuya fabricación y uso han sido restringidos y/o prohibidos (Stockholm Convention SC-4/17 2009; Stockholm Convention SC-4/14 2009; Stockholm Convention SC-4/18 2009).

La producción global de sustancias químicas aumentó en el periodo de 1930-2000, de 1 millón a 400 millones de toneladas por año (Gavrilescu et al. 2015). Aunque existen diferentes fuentes y tipos de contaminación, el desarrollo incontrolado de múltiples actividades industriales, de transporte, de agricultura y de construcción ha sido el principal causante de la emisión de contaminantes y por ende, de la actual contaminación ambiental. El gran interés suscitado hacia algunas de las categorías de contaminantes emergentes, se centra en aquellos con estructuras y propiedades particulares que interfieren en los sistemas hormonales, conocidos como disruptores endocrinos, y de los cuales no existen ni regulación ni información suficiente referente a sus propiedades toxicológicas, a sus niveles en el medio ambiente, su destino y su impacto en la salud y el

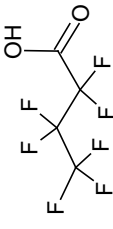
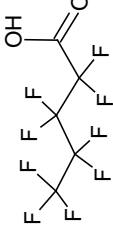
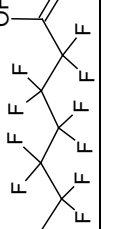
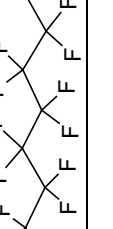
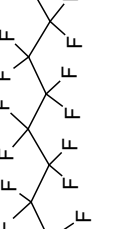
medio ambiente (EFSA 2012a; EFSA 2011; EFSA 2012b). Algunos de los contaminantes emergentes que pueden tener efectos como disruptores endocrinos o alteradores del sistema endocrino son las sustancias retardantes de llama y otros productos químicos industriales como las sustancias alquil perfluoradas (Gavrilescu et al. 2015). Recientemente, se han acordado criterios científicos para la identificación y evaluación del efecto disruptor endocrino para autorizar plaguicidas y biocidas en virtud de la legislación de la UE (ECHA & EFSA 2018; Reglamento (UE) No 2018/605 de la Comisión 2018; Reglamento (UE) No 528/2012 del Parlamento y Consejo Europeo 2012).

Aunque se han realizado estudios referentes a la presencia, fuentes, niveles y comportamiento en el medioambiente (Brits et al. 2016; Buck et al. 2011; Kim et al. 2011; Cariou et al. 2015), todavía existe una importante falta de información en cuanto a las vías y fuentes de exposición de los contaminantes emergentes, probablemente debido, entre otras causas, a sus propiedades físico-químicas y características medioambientales, las cuales pueden llevar a comportamientos inesperados de estos contaminantes en aire, agua, suelo o alimentos. Ejemplo de estos comportamientos inesperados es el transporte de estas sustancias a largas distancias, ya que se han encontrado niveles de retardantes de llama fosforados y plastificantes en la materia particulada del aire, en muestras de pinocha, agua de lluvia y nieve, en áreas remotas (Reemtsma et al. 2008). También se han encontrado niveles de PBDEs en tejido adiposo de osos polares, en mamíferos marinos del Ártico y del Atlántico norte (Law et al. 2014), y de muchas otras sustancias en áreas remotas del planeta, demostrando la capacidad de dispersión y movilidad de éstas (Donaldson et al. 2010).

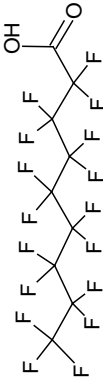
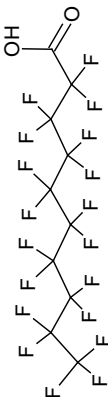
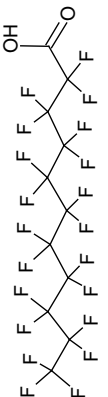
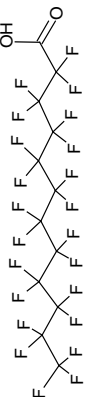
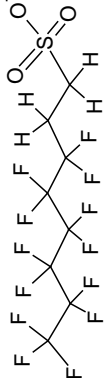
Esta falta de información es, probablemente, debida, entre otras, a la necesidad de usar técnicas instrumentales complejas y sensibles, capaces de llegar a niveles de concentración bajos, así como a la necesidad de desarrollar nuevas metodologías analíticas para matrices ambientales, alimentarias y biológicas.

A modo de resumen, en la **Tabla 1** se indican las familias y compuestos estudiados en la presente **Tesis Doctoral**, incluyendo sus estructuras moleculares, aplicaciones y toxicidad.

**Tabla 1.** Contaminantes orgánicos emergentes objeto de estudio, estructura molecular, toxicidad y aplicaciones.

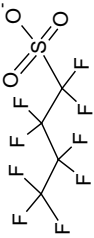
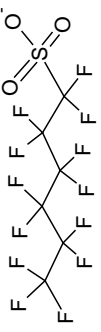
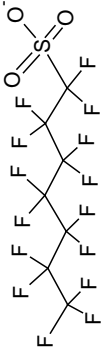
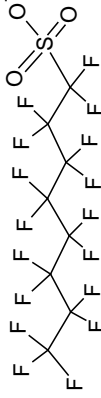
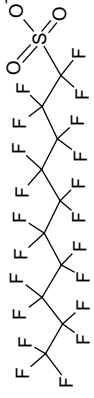
Familias	Compuestos	Acrónimos	Estructura molecular	Toxicidad	Aplicaciones
<b>Sustancias alquil Perfluoradas (PFAS)</b>					
Ácido Perfluorobutanoico	PFBA		Possible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)	
Ácido Perfluoropentanoico	PFPeA		Possible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)	
Ácido Perfluorohexanoico	PFHxA		Possible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)	
Ácido Perfluoroheptanoico	PFHpA		Possible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)	
Ácido Perfluorooctanoico	PFOA		Possible inmunotóxico, carcinogénico, alterador de la hormona tiroides y reprotóxico (Rand and Mabury 2017; Winkens et al. 2017)	Surfactante. En la fabricación de fluoropolímeros (Buck et al. 2011)	

Ácidos Carboxílicos alquil perfluorados (PFCA)

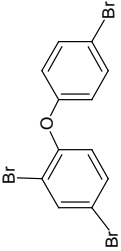
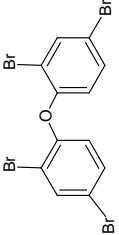
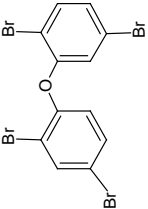
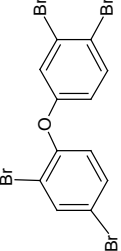
Familias	Compuestos	Acrónimos	Estructura molecular	Toxicidad	Aplicaciones
<b>Sustancias alquil Perfluoradas (PFAS)</b>					
	Ácido Perfluorononanoico	PFNA		Posible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)
	Ácido Perfluorodecanoico	PFDA		Posible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)
	Ácido Perfluoroundecanoico	PFUnDA		Posible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)
	Ácido Perfluorododecanoico	PFDoDA		Posible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)
	Sulfonato de 6:2 fluorotelómero	6:2 FTS		Posible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)

Ácidos Carboxílicos alquil perfluorados (PFCAs)

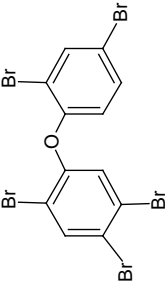
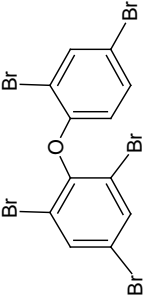
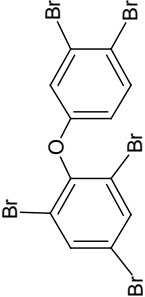
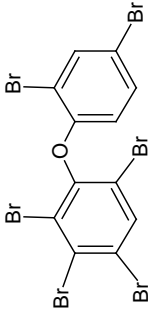


Familias	Compuestos	Acrónimos	Estructura molecular	Toxicidad	Aplicaciones
<b>Sustancias alquil Perfluoradas (PFAS)</b>					
	Sulfonato de Perfluorobutano	PFBS		Possible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)
	Sulfonato de Perfluorohexano	PFHxS		Possible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)
	Sulfonato de Perfluoroheptano	PFHpS		Possible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)
	Sulfonato de Perfluorooctano	PFOS		Possible hepatotóxico, carcinogénico, reprotóxico y alterador de la hormona tiroides. (Surma and Zieliński 2015)	Surfactante (Buck et al. 2011)
	Sulfonato de Perfluorodecano	PFDS		Possible alterador de la hormona tiroides e inmunotóxico (Winkens et al. 2017)	Surfactante (Buck et al. 2011)

Sulfonatos de perfluoroalcano (PFSAs)

Familias	Compuestos	Acronimos	Estructura molecular	Toxicidad	Aplicaciones
<b>Retardantes de llama bromados (BFRs)</b>					
	2,4,4'-Tribromodifenil éter	BDE-28		Posible disruptor endocrino, neurotóxico y reprotoxico (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)
	2,2',4,4'-Tetrabromodifenil éter	BDE-47		Posible disruptor endocrino, neurotóxico y reprotoxico (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)
	2,2',4,5'-Tetrabromodifenil éter	BDE-49		Posible disruptor endocrino, neurotóxico y reprotoxico (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)
	2,3',4,4'-Tetrabromodifenil éter	BDE-66		Posible disruptor endocrino, neurotóxico y reprotoxico. (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)

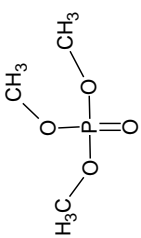
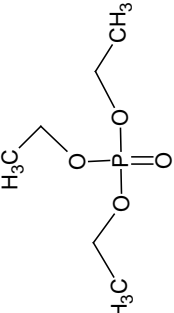
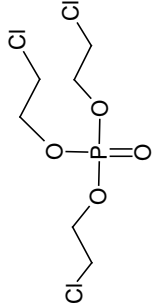
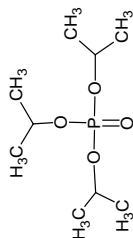
Polibromodifenil éteres (PBDEs)

Familias	Compuestos	Acrónimos	Estructura molecular	Toxicidad	Aplicaciones
<b>Retardantes de llama bromados (BFRs)</b>					
	2,2',4,4',5-Pentabromodifenil éter	BDE-99		Disruptores endocrinos, neurotóxicos y reprotoxicos (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)
	2,2',4,4',6-Pentabromodifenil éter	BDE-100		Disruptores endocrinos, neurotóxicos y reprotoxicos (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)
	2,3',4,4',6-Pentabromodifenil éter	BDE-119		Disruptores endocrinos, neurotóxicos y reprotoxicos (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)
	2,2',3,4,4',6-Hexabromodifenil éter	BDE-139		Posible disruptor endocrino, neurotóxico y reprotoxico. (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)

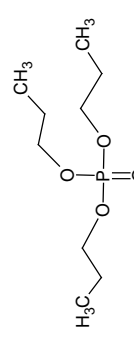
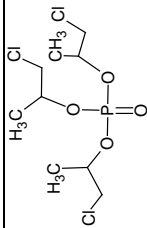
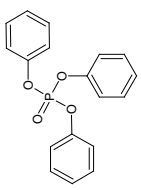
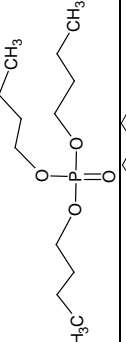
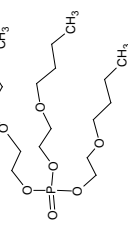
Polibromodifenil éteres (PBDEs)

Familias	Compuestos	Acrónimos	Estructura molecular	Toxicidad	Aplicaciones
<b>Retardantes de llama bromados (BFRs)</b>					
	2,2',4,4',5,5'-Hexabromodifenil éter	BDE-153		Posible disruptor endocrino, neurotóxico y reprotóxico (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)
	2,2',4,4',5,6'-Hexabromodifenil éter	BDE-154		Posible disruptor endocrino, neurotóxico y reprotóxico (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)
	2,2',4,4',6,6'-Hexabromodifenil éter	BDE-155		Posible disruptor endocrino, neurotóxico y reprotóxico (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)
	2,2',3,4,4',5',6'-Heptabromodifenil éter	BDE-183		Posible disruptor endocrino, neurotóxico y reprotóxico (Chen et al. 2014)	Retardante de llama (European Food Safety Authority 2011)

Polibromodifenil éteres (PBDEs)

Familias	Compuestos	Acrónimos	Estructura molecular	Toxicidad	Aplicaciones
<b>Compuestos Organofosforados (OPs)</b>					
	Trimetil fosfato	TMP		Genotóxico (Wei et al. 2015)	En procesos de fabricación (Wei et al. 2015)
	Trietil fosfato	TEP		Datos limitados: posible disruptor endocrino (Hendriks and Westerink 2015)	Plastificante, antiespumante (Wei et al. 2015)
	Tris(2-cloroetil) fosfato	TCEP		Carcinógeno (Wei et al. 2015)	Retardante de llama, plastificante y antiespumante (Wei et al. 2015)
	Tri-iso-propil fosfato	TiPrP		Datos limitados: posible disruptor endocrino (Hendriks and Westerink 2015)	Plastificante (Wei et al. 2015)

Retardantes de llama fosforados (PFRs) y plastificantes

Familias	Compuestos	Acrónimos	Estructura molecular	Toxicidad	Aplicaciones
<b>Compuestos Organofosforados (OPs)</b>					
	Tri-n-propil fosfato	TnPrP		Datos limitados: posible disruptor endocrino (Hendriks and Westerink 2015)	Plastificante (Wei et al. 2015)
	Tris(2-cloroisopropil) fosfato	TCPP		Posible carcinógeno (van der Veen and de Boer 2012)	Retardante de llama y plastificante (Wei et al. 2015)
	Trifenil fosfato	TPhP		Posible neurotóxico Efectos adversos en fertilidad (van der Veen and de Boer 2012)	Retardante de llama, plastificante (Wei et al. 2015)
	Tri-n-butil fosfato	TnBP		Neurotóxico (Wei et al. 2015)	Plastificante y agentes antiespumantes (Wei et al. 2015)
	Tri(butoxietyl) fosfato	TBEP		Posible carcinógeno (van der Veen and de Boer 2012)	Plastificante (Wei et al. 2015)

Retardantes de llama fosforados (PFRs) y plastificantes

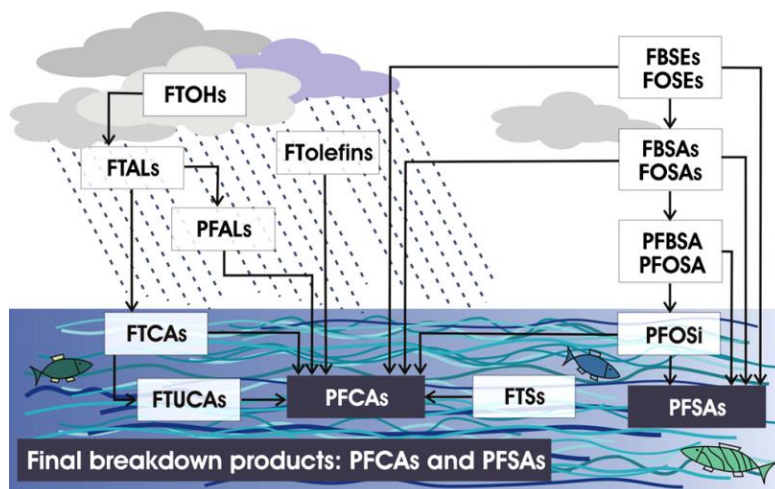
## 2.1. Sustancias Alquil Poli- y Perfluoradas (PFASs)

Las sustancias alquil poli- y perfluoradas se caracterizan por tener estructura molecular que consta de una cadena alquílica hidrofóbica en la que los átomos de hidrógeno se reemplazan parcial (sustancia alquil polifluorada) o completamente (sustancia alquil perfluorada) por átomos de fluor. La longitud de la cadena varía normalmente de  $C_4$  a  $C_{16}$ , y está unida a un grupo final hidrofílico, el cual puede ser neutro o estar cargado positiva o negativamente; los más comunes son los grupos hidroxilo, sulfonato, ácido carboxílico y amonio. El enlace C-F es particularmente fuerte, y es resistente a degradarse frente a reacciones ácido-base y de oxidación-reducción, lo que hace que las sustancias que los contienen sean extraordinariamente estables tanto química como térmicamente. A pesar de ello, algunas PFASs sufren transformaciones químicas, que afectan principalmente a las partes hidrofílicas de la molécula (Fromme et al. 2009; Surma & Zieliński 2015). En matrices biológicas, las PFASs no se acumulan en la grasa, a diferencia de los COPs, que generalmente son sustancias lipofílicas, sino que están unidas a las proteínas del suero, particularmente a la albúmina (Forns et al. 2015). Su carácter anfifílico, que les proporciona propiedades tensioactivas, hace que las PFASs hayan sido utilizadas, y se utilicen ampliamente, desde la década de los 50 para fines industriales. Las PFASs se utilizan en la fabricación de diversos materiales como superficies anti-manchas en alfombras, cuero y textiles; como repelentes de agua, grasa y aceite en tableros y productos de papel desechables; tratamientos anti-adherencia en utensilios de cocina; pinturas, adhesivos y productos de limpieza; en la fabricación de semiconductores, aplicaciones fotográficas industriales, y en espumas de lucha contra incendios. La enorme producción de estas sustancias, motivada por su amplio uso, así como los procesos de eliminación de los productos que las contienen, ha causado que se distribuyan de manera global por el medio ambiente, llegando a la cadena alimentaria y por tanto, a los humanos (EFSA 2012b).

Las PFASs se dividen, principalmente, en PFASs iónicas y neutras. Las PFASs iónicas engloban un gran número de familias que se diferencian principalmente por el grupo hidrofílico al que está unida la cadena alquílica. Las más conocidas son el sulfonato de perfluorooctano (PFOS), perteneciente al grupo de los sulfonatos de perfluoroalcano (PFASs), y el

ácido perfluorooctanoico (PFOA), del grupo de los ácidos carboxílicos alquil perfluorados (PFCAs) (Surma & Zielinski 2015; Buck et al. 2011).

Entre las PFASs neutras, hay que destacar los alcoholes telómeros fluorados (FTOHs), los cuales son producidos vía procesos de telomerización (Rand & Mabury 2017) y son utilizados como intermediarios en la síntesis de tinta, pinturas, adhesivos, polímeros, etc. Son alcoholes polifluoroalquílicos de cadena larga. Los acrilatos de telómeros fluorados (FTAs), sulfonamidas de alquil-fluorooctano (FOSAs), sulfonamidoetanoles de alquil-fluorooctano (FOSEs) son otros de los grupos de compuestos dentro de las PFASs neutras. Todos ellos se caracterizan por su elevada volatilidad, por su capacidad de ser transportados por la atmósfera largas distancias, y por sufrir transformaciones en los procesos bióticos y abióticos de degradación medioambiental, dando lugar a PFASs iónicas, generalmente a PFCAs y PFSAs (Fromme et al. 2009; Müller et al. 2012; Surma & Zielinski 2015). En la **Figura 5** se pueden ver, a modo de ejemplo, los productos de degradación final obtenidos en función de las PFASs de que se parta.



**Figura 5.** Productos de degradación final, como algunos PFCAs y PFSAs, obtenidos a partir de algunas de las PFASs neutras (Okál'ová 2014).

Una vez reconocidas las siguientes particularidades de estos compuestos:

- i) que tanto la mayoría de los PFCAs como de los PFSAs, son compuestos extremadamente estables y persistentes,



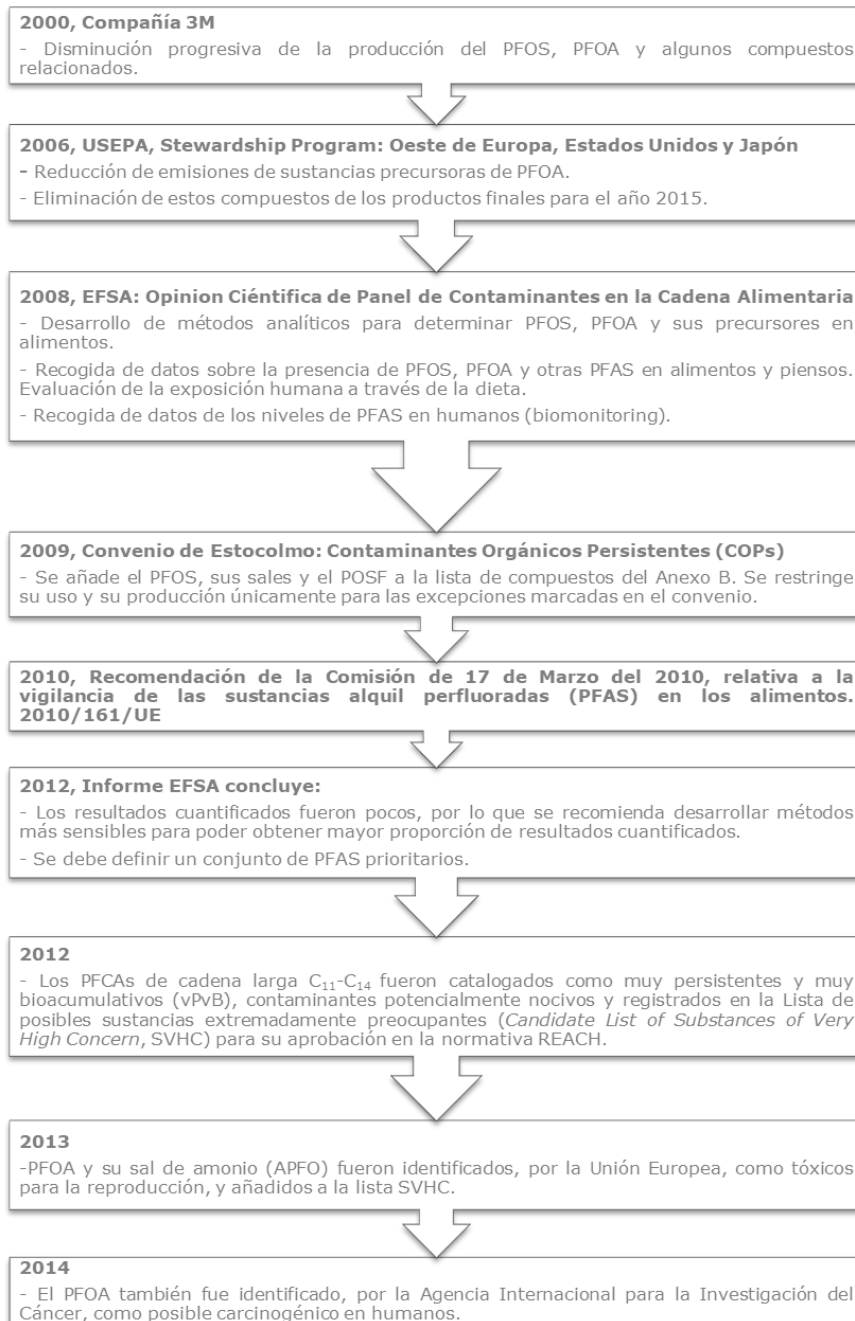
- ii) que son ubicuos, es decir, encontrados en todos los compartimentos del medioambiente (aire, agua, alimentos, etc.) desde zonas urbanas a remotas,
- iii) que son bioacumulativos,
- iv) y la creciente preocupación en salud pública en cuanto a su toxicidad;

se comenzó a tomar medidas para reducir la producción, y por tanto, la emisión de estos compuestos al medio ambiente (Krafft & Riess 2015). En la **Figura 6** se puede ver un esquema sobre la evolución de las medidas adoptadas en las últimas décadas.

Desde el año 2000 hasta el 2015 se han adoptado una serie de medidas sucesivas para reducir e incluso eliminar el uso de estos contaminantes (EFSA 2008; Recomendación 2010/161/UE de la Comisión 2010; EFSA 2012b; ECHA 2017; Stockholm Convention SC-4/17 2009). Sin embargo, estas medidas han sido aplicadas, únicamente, en el oeste de Europa, Estados Unidos y Japón, mientras que en zonas de Asia (China), del Este de Europa (Polonia), en Rusia y en la India, donde no se han adoptado estas medidas, ha aumentado considerablemente la producción de PFASs (Krafft & Riess 2015).

La principal fuente de exposición humana a estas sustancias es la ingesta de alimentos seguida por la inhalación del aire ambiente, aire interior o polvo contaminado en interiores o exteriores. Los niveles de sustancias alquil perfluoradas (PFAS) encontrados en alimentos se centran, principalmente, en pescado y productos de la pesca y en algún caso en carnes y derivados cárnicos, ya que es donde se han encontrado concentraciones más altas de estas sustancias, sobre todo de PFOS (concentración media en pescados y carnes, 1.99 ng/g y 29.5 ng/g, respectivamente) (EFSA 2012b), para el caso del PFOA, 0.78 y 0.082 ng/g en carnes y pescados, respectivamente. Se han detectado niveles de PFOS y PFOA en pescado en la República Checa (media PFOS y PFOA: 14.5 y 0.039 ng/g, respectivamente) (Svihlikova et al. 2015), en Estados Unidos se han detectado niveles de PFOS en pescados en un intervalo de 0.85 - 180 ng/g (Stahl et al. 2014) y en España se obtuvieron, también en pescados, concentraciones más altas para el PFOS con valores que oscilaban entre 24 - 54 ng/g exceptuando un punto de

muestreo (cerca a una planta de tratamiento de aguas residuales, WWTP) en el que la concentración de PFOS fue de 1062 ng/g (Zabaleta et al. 2015).



**Figura 6.** Cronograma de las medidas adoptadas para la reducción del uso de PFAS.

Pese a los datos existentes, tanto la recomendación de 2010 sobre vigilancia de PFAS en alimentos (Recomendación 2010/161/UE de la Comisión 2010) como la Agencia de Seguridad Alimentaria Europea indican que todavía faltan datos e información para poder establecer la relevancia del efecto de algunas PFAS en la salud humana (EFSA 2012b), y que, por tanto, se requiere de metodologías más sensibles para conseguir más resultados y así realizar evaluaciones de la exposición más fiables.

En cuanto a la prevalencia de las PFAS en el medio ambiente, se ha detectado la presencia de los mismos en áreas muy diversas, por ejemplo, en Suiza (en zona urbana) se obtuvieron los niveles más altos para el PFOA y PFBA (7.7 y 7.0  $\text{pg}/\text{m}^3$ , respectivamente), también en zona rural se obtuvieron concentraciones menores pero con presencia de todas las PFAS analizadas (PFOA y PFBA, 1.7 y 2.8  $\text{pg}/\text{m}^3$ , respectivamente) (Müller et al. 2012). En el norte de China se han encontrado niveles muy altos de estas sustancias, tanto en zona industrial y urbana como en rural y remota, por ejemplo, el PFOA y el PFOS: 3.3 - 3820  $\text{pg}/\text{m}^3$  (zona industrial) y 9.5 - 273  $\text{pg}/\text{m}^3$  (zona rural) para el PFOA, 1.57 - 3830  $\text{pg}/\text{m}^3$  (zona industrial) y 2.2 - 182  $\text{pg}/\text{m}^3$  (zona rural) para PFOS (Yao et al. 2017). Incluso se han detectado niveles de PFAS en zonas remotas del Ártico, 0.0063 - 5.5  $\text{pg}/\text{m}^3$  para PFOA y 0.0063 - 2.8  $\text{pg}/\text{m}^3$  para PFOS (Wong et al. 2018). A pesar de la cantidad de datos existentes en aire ambiente, sobre todo para PFOA y PFOS, existe todavía falta de información en cuanto a toxicología y evaluación de la exposición para el resto de PFAS (Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2018).

En matrices biológicas, cabe destacar el aumento de estudios en este campo durante los últimos años (Antignac et al. 2013; Cariou et al. 2015; Bartolomé et al. 2017), con el fin de conocer la exposición real en humanos y establecer las actuaciones y medidas correspondientes. Ejemplo de ello es la iniciativa "*Human Biomonitoring for Europe*" (HBM4EU), la cual pretende promover la biomonitorización de ciertos contaminantes emergentes con el fin de proporcionar y facilitar evidencias sobre la exposición actual a estos contaminantes (HBM4EU - German Environmental Agency 2017).

## 2.2. Retardantes de llama (FRs)

Los retardantes de llama son un grupo amplio y diverso de sustancias químicas, que se utilizan en grandes cantidades (National Research Council 2000), y que suelen agruparse en cuatro familias:

- a) Sales inorgánicas.
- b) Compuestos de fósforo, como organofosfatos y halógenofosfatos.
- c) Compuestos de nitrógeno, como melamina y sus derivados.
- d) Compuestos orgánicos halogenados, como parafinas cloradas o compuestos aromáticos bromados (p.e. PBDEs).

Estas sustancias se añaden a multitud de productos comerciales para retrasar la ignición del fuego. Algunos de los productos a los que se aplican son: televisores, ordenadores, tejidos y alfombras, aislamientos para construcción y mobiliario. Además, se unen a los materiales como aditivos o de forma covalente. En los casos en que se unen como aditivos, los retardantes de llama son liberados con relativa facilidad al medio ambiente, bien durante su uso, tras su eliminación o durante su reciclado (Papachlimitzou et al. 2012; Fromme et al. 2016).

Los retardantes de llama se pueden clasificar según el estado de conocimiento y presencia de los mismos, así como por su impacto en la salud y en el medio ambiente (Bergman et al. 2012):

- Establecidos: sustancias de las cuales se tiene documentación extensa en cuanto a producción y uso como retardantes de llama, propiedades físico-químicas, exposición, y problemas medioambientales y de salud.
- Emergentes: sustancias de las que se posee documentación referente a su producción y a su uso como retardantes de llama, y que está demostrada su presencia y distribución en el medioambiente (agua, aire, suelo, alimentos e incluso humanos).
- "Novel": sustancias documentadas como potenciales retardantes de llama que se han encontrado en materiales o en productos.
- Potenciales: sustancias informadas por tener posibles aplicaciones como retardantes de llama.

### *Retardantes de llama bromados (BFRs): Polibromodifenil éteres (PBDEs)*

Los polibromodifenil éteres constituyen una de las familias de compuestos bromados más ampliamente utilizados como sustancias retardantes de llama. Los PBDEs presentan estructura de difenil éter, es decir, dos anillos bencénicos unidos mediante un puente de éter. Cada anillo puede contener hasta cinco sustituyentes de bromo. De este modo, se puede obtener desde los monobromodifenil éteres hasta el decabromodifenil éter, pudiéndose computar un total de 209 congéneres teóricos (Fromme et al. 2016).

En general, son sustancias estables, especialmente los PBDEs que presentan de cuatro a ocho sustituciones de bromo. Los principales productos técnicos elaborados son PentaBDE, OctaBDE y DecaBDE, con presencia en menor proporción de tri-, tetra-, hexa-, hepta-, y nona-BDEs (De Wit 2002). Comenzaron a utilizarse en los años 70, y se han llegado a producir hasta 80000 toneladas anuales de PBDEs (EFSA 2011). Se consideran compuestos persistentes y bioacumulativos, excepto el BDE-209 que tiende a degradarse en procesos bióticos y abióticos dando congéneres de PBDEs de siete a nueve sustituciones de bromo. Son lipofílicos, y tienden a ser transportados por la atmósfera largas distancias (EFSA 2011).

Cuando se utilizan como aditivos en, por ejemplo, dispositivos electrónicos, tapicerías y alfombras, espumas de poliuretano, resinas, etc... (Fromme et al. 2016) pueden ser liberados al medioambiente por diferentes vías y procesos:

- i) Durante su producción
- ii) Durante el transporte, manipulación y ciclo de vida de los productos de consumo tratados con PBDEs (degradación, reciclaje y eliminación).

Aunque, pueden encontrarse en las aguas residuales o en los vertederos de residuos sólidos, su liberación ocurre principalmente al aire (fase particulada y gaseosa), especialmente si los materiales son incinerados en fuegos no controlados.

A pesar de que los datos de toxicidad de los PBDEs son limitados, se apunta a que son disruptores endocrinos. Sus órganos diana son el hígado y la

hormona tiroidea y se sospecha que afectan al desarrollo del sistema nervioso y reproductivo (Fromme et al. 2016; WHO and UNEP 2013).

A partir de 2004 comenzó a ser de gran preocupación la exposición a estas sustancias, y fueron prohibidos por la comisión europea en agosto de 2004 los penta-BDE y los octa-BDE (Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council 2003). A partir de ese momento y debido a su distribución global por el medio ambiente, tanto en alimentos, aire, suelo, e incluso en humanos, fueron considerados como contaminantes ambientales y fue reduciéndose el uso de los PBDEs mediante restricciones establecidas por la Comisión Europea y el Parlamento Europeo (EFSA 2011). En 2009, los grupos de los tetrabromodifenil, pentabromodifenil, hexabromodifenil y heptabromodifenil éteres fueron añadidos al listado de compuestos clasificados como COPs en el Convenio de Estocolmo, en el cual se prohíbe la producción de estos compuestos, y se restringe su uso según indica en el convenio (Stockholm Convention SC-4/14 2009; Stockholm Convention SC-4/18 2009). Sin embargo, el deca-BDE no fue clasificado como COP, por lo que continuó utilizándose como retardante de llama, aun sabiendo que se degrada dando lugar a congéneres con menos sustituciones de bromo, como penta- u octa-BDEs.

El Deca-BDE fue registrado en el REACH a finales de agosto de 2010, y se obliga a las empresas que fabrican, comercializan o usan dicha sustancia química u otras incluidas en las mismas, a recoger la información de las propiedades toxicológicas de los mismos y enviarla a la ECHA (European Commission SEC(2010)387 2010). Su uso ha sido restringido en Europa en aparatos eléctricos y electrónicos, aunque se continúa permitiendo en textiles, automóviles y construcción (exenciones especificadas en el Reglamento (UE) Nº 757/2010). En mayo de 2013, el deca-BDE fue propuesto por Noruega como sustancia a incluir en la lista de COPs del Convenio de Estocolmo. Así mismo, la ECHA preparó en agosto de ese mismo año una «Propuesta de restricción de Deca-BDE» con fecha de presentación de agosto de 2014 (Lechuga & Paredes 2014).

En 2011, el Panel en Contaminantes en la Cadena Alimentaria (CONTAM) publicó la "Opinión Científica sobre PBDEs en alimentos". Basándose en la composición de las mezclas técnicas de PBDEs, en su presencia en el medioambiente y en los datos de toxicidad, consideró que los siguientes

ocho congéneres de PBDEs eran de interés primario, y que podían ser considerados como marcadores de exposición a través de la dieta: BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154, -183 y -209 (EFSA 2011). Posteriormente, algunos de los PBDEs fueron incluidos en la recomendación de la comisión del 3 de marzo de 2014 sobre la vigilancia de los residuos de los materiales ignífugos bromados en los alimentos. En la **Figura 7** se indican los PBDEs y las matrices sobre las que se debe realizar la vigilancia (Recomendación 2014/118/UE de la Comisión 2014).



**Figura 7.** PBDEs y alimentos en los que se debe realizar la vigilancia según la recomendación 2014/118/UE.

Aunque existen suficientes estudios sobre la prevalencia de PBDEs en muestras de alimentos (EFSA 2011), sobre todo en pescados,  $\Sigma$ PBDE de 0.4 - 1.3 ng/g peso fresco en Cataluña (Trabalón et al. 2017) o  $\Sigma$ PBDE de 135 - 360 ng/g grasa en Illinois (USA) (Widelka et al. 2016), se requiere de metodologías sensibles para realizar análisis de PBDEs de control oficial en otros tipos de matrices alimenticias, y así dar soporte a la recomendación mencionada más arriba (Recomendación 2014/118/UE de la Comisión 2014). Del mismo modo que con las PFAS, ha habido un aumento considerable de estudios de los PBDEs en matrices biológicas, tanto en matrices invasivas (sangre o suero,  $\Sigma$ PBDE<sub>5</sub>=43.6 - 85.8 ng/g) (Parry et al. 2018) como en no-invasivas (orina, pelo, uñas o leche materna:  $\Sigma$ PBDE<sub>17</sub> =

11.48 ng/g grasa) (Chen et al. 2014; Parry et al. 2018). Los BFRs, y entre ellos algunos PBDEs, forman parte de los contaminantes emergentes de interés dentro del programa de biomonitorización HBM4EU (HBM4EU - German Environmental Agency 2017).

### 2.3. Compuestos organofosforados (OPs)

Debido a la reducción, restricciones y reglamentos sobre la producción y uso de algunos retardantes de llama bromados, como los PBDEs, se han propuesto e introducido sustancias retardantes de llama alternativas, como son algunos de los compuestos organofosforados, denominados retardantes de llama fosforados (PFRs). Los PFRs, además de haber sido utilizados ya durante décadas, son considerados sustitutos adecuados de los BFRs (Liagkouridis et al. 2015; Wei et al. 2015). Son identificados como contaminantes "re-emergentes" (Reemtsma et al. 2008).

Los OPs no presentan una estructura molecular única, constan de un grupo fosfato al que pueden ir unidos diferentes sustituyentes, como cadenas alquílicas, halogenadas (por ejemplo, tris(2-cloroetil) fosfato, TCEP) o no halogenadas (por ejemplo, tri-n-butil fosfato, TnBP); o grupos aromáticos con y sin ramificaciones alquílicas (por ejemplo, trifenil fosfato, TPhP) (Möller et al. 2012).

Se utilizan como retardantes de llama, como plastificantes y como agentes anti-espumantes en una gran variedad de productos: plásticos, mobiliario, tejidos, electrónica, construcción, e incluso en la industria automovilística y del petróleo (Wei et al. 2015). Generalmente, los compuestos organofosforados halogenados se usan como retardantes de llama. Mientras que los compuestos organofosforados no halogenados se utilizan principalmente como plastificantes y también en algunos casos como retardantes de llama plastificantes (**Tabla 1**).

Los OPs halogenados son altamente persistentes, mientras que la persistencia de los OPs no halogenados depende de la longitud de la cadena alquílica, aumentando de manera proporcional con la longitud de la misma. En general, no son considerados compuestos lipofílicos, sin embargo, debido a la variabilidad de polaridades que presentan, pueden ser hidrofílicos y volátiles (TMP, cadena alquílica corta,  $\log K_{ow} -0.65$ ,  $V_p 8 \cdot 10^{-1}$  Torr) o hidrofóbicos y no volátiles (TEHP, grupos etilhexil grandes,  $\log K_{ow} 9.5$ ,  $V_p$



$8 \cdot 10^{-8}$  Torr). Por ello, aunque existe falta de información frente alguna de sus propiedades como la capacidad de transportarse a media o larga distancia, se les considera semi-volátiles. Presentan también bioacumulación y biomagnificación limitada (Reemtsma et al. 2008; Möller et al. 2012).

En cuanto a la toxicidad característica de estas sustancias, a pesar de que existe todavía gran desconocimiento al respecto, algunas de ellas están ya catalogadas como carcinogénicas (TCEP), genotóxicas (TMP) o neurotóxicas (TnBP), y otras, simplemente, son sospechosas de generar efectos adversos en la salud (**Tabla 1**) (Wei et al. 2015).

Los OPs no se enlazan químicamente al material original, es decir, son aplicados como aditivos. Por tanto, resultan fácilmente liberados al medioambiente por abrasión, volatilización y disolución. Lo que da lugar a que, junto con el aumento creciente del consumo de estas sustancias en los últimos años, se encuentren distribuidos amplia y globalmente en el medioambiente, generando, como resultado, un interés creciente por los mismos (Möller et al. 2011).

Aunque se han realizado estudios de evaluación de la exposición a través de aire (en interiores:  $\Sigma$ OPs 11400 - 589000  $\text{pg}/\text{m}^3$ , siendo las más elevadas las correspondientes a tiendas de muebles; en exteriores:  $\Sigma$ OPs 1 - 99000  $\text{pg}/\text{m}^3$ ), agua ( $\Sigma$ OPs 76 - 26100  $\text{ng}/\text{L}$  en agua de ríos, 92 - 1390  $\text{ng}/\text{L}$  en agua de mar), y polvo ( $\Sigma$ OPs, 0.02 - 15100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), todavía son pocos los estudios que han abordado la presencia de estas sustancias en alimentos, biota, pescados y en matrices biológicas como leche materna (Wei et al. 2015). Y por tanto, existe falta de información en cuanto a toxicidad, propiedades (transporte a media o largas distancias, bioacumulación y biomagnificación) y evaluación del riesgo tanto en exposición externa como interna.

### 3. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA EL ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EMERGENTES

Para el análisis de contaminantes emergentes en matrices complejas, como son las matrices ambientales (aire), las alimentarias (pescado), y las biológicas (leche materna), es necesaria la combinación de distintas etapas de extracción y purificación con una etapa de determinación, en la que se utilizan técnicas analíticas basadas en el acoplamiento de técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas. En la **Tabla 2**, se muestra la revisión bibliográfica realizada sobre las metodologías analíticas utilizadas para el análisis de este tipo de sustancias en matrices de aire, pescado y leche materna, en un periodo de tiempo aproximado de siete años (2011 - 2018).

#### 3.1. Etapas de extracción y purificación

El análisis multi-residuo en matrices ambientales, alimentarias y biológicas requiere la correcta elección de las técnicas de preparación de la muestra, teniendo en cuenta que éstas van a depender principalmente de las características físico-químicas de los analitos y de la matriz a estudiar. Las distintas etapas de la preparación de muestra y la determinación, junto con algunas de las técnicas más utilizadas en cada una, se indican en la **Figura 8**.



**Figura 8.** Etapas del proceso analítico y listado de técnicas analíticas más representativas de cada una de ellas.

**Tabla 2.** Revisión bibliográfica sobre el análisis de contaminantes emergentes (PFASs, PBDEs y OPs) en muestras medioambientales (aire), alimentarias (pescado) y biológicas (leche materna) de 2011 a 2018.

Compuestos	Grupo	Matriz	Extracción	Purificación	Instrumental	Columna analítica	R (%) / Límites	Comentarios	Ref.
25 compuestos	OCPs	Aire: QFF PUF	Soxhlet n-hexano/Acetona (4:1, v/v)	Columnas de sílica	GC-(EI)-HRMS Inyector split/splitless Modo splitless	DB-5 MS, 60m x 0,22mm i.d. x 0,25 µm. TRS-MS, 15m x 0,25mm i.d. x 0,1µm	45 – 136 % MDL: 0,001 – 0,64 pg/m <sup>3</sup>	Recuperaciones absolutas de los surrogates	R. Bossi 2016
13 compuestos	PBDEs						90 – 106 % MDL: 0,01 – 0,12 pg/m <sup>3</sup>		
Di-BDEs a hepta-BDEs, PBEB, PBT, hBB, pTBX, PBB-153.	BFRs	Aire: PUF	Soxhlet n-hexano/Acetona (1:1, v/v)	Columna sílica/alúmina	GC-(ECNI)-MS Inyector split/splitless Modo splitless	DB-XLB, 30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm. DB-15HT, 15m x 0,25mm i.d. x 0,1 µm.	73 – 98 % LD: 0,14 – 1,31 pg/m <sup>3</sup>	Recuperaciones absolutas de los surrogates	N. Ding 2016
Octa-BDEs a Deca-BDEs, DBDPE, BTBPT, PBB-209.									
25 compuestos	PFAS	Aire: GFF	Ultrasonidos Metanol	Centrífuga 10 min, 5000 rpm.	HPLC-(ESI(-))- MS/MS	Synergi Hydro RP 80A (150 x2 mm, 4µm)	MQL: 10 – 150 pg/muestra		A. Dreyer 2015
8 compuestos	OPs	Aire: GFF PUF	Soxhlet Diclorometano	Columna sílica gel 10 % desactivada	GC-(EI)-MS Inyector PTV Modo pulsed- splitless	HP-5MS, 30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm.	77 – 111 % MDL: 1 – 94 pg/m <sup>3</sup>	Recuperaciones relativas	A. Möller 2011
12 PBDEs, p- TBX, PBBZ, PBT, HBBZ, DPTE, BTBPE, PBEB, γ- HBCD DBDPE, BDE- 209	PBDEs (BFRs) NBFRs	Aire: GFF PUF	Soxhlet n-hexano/Acetona (1:1, v/v)	Columna sílica gel	GC-(ECNI)-MS	HP-5MS, 30m x 0,25mm i.d. x 0,4µm. DB-5MS, 15m x 0,25mm i.d. x 0,1 µm.	89 – 135 % LOD: 0,017 – 2,9 pg/m <sup>3</sup>	Recuperaciones relativas	H. Qi 2014
6 PBDEs (high brominated). α-, β-, γ-HBCD	BFRs	Aire: GFF	Soxhlet n-hexano/Acetona alúmina (1:1, v/v)	Columna sílica ácida, neutra, básica, alúmina neutra y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anh.	GC-(EI)-MS/MS Inyector splitless Modo splitless HPLC-(ESI(-))- MS/MS	DB-5MS, 15m x 0,25mm i.d. x 0,1 µm. XDB-C18 (50 mm x 2,1 mm, 1,8 µm)	43 – 96 % LC: 80 pg/m <sup>3</sup> para high-BDEs 75 – 87 % LC: 0,5 pg/m <sup>3</sup> para HBCDs	Recuperaciones medias relativas Recuperaciones medias de los surrogates	Y. Zhu 2018

Compuestos	Grupo	Matriz	Extracción	Purificación	Instrumental	Columna analítica	R (%) / Límites	Comentarios	Ref.
4 compuestos	OPFRs	Aire (PM2.5, membrana)	SLE n-hexano/Acetona (1:1, v/v)	SPE Florisil	GC-MS	DB-5MS, 30m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm.	83 – 105 % LD: 0,05 – 0,2 pg/m <sup>3</sup>		W. Deng 2018
23 PBDEs 13 NBFRs (non-PBDEs) 2 DPps	HFRs	Aire: GFF PUF Soxhlet Diclorometano (GFF) n-hexano/Acetona (1:1, v/v) (PUF)		Columna sílica gel activada y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anh.	GC-(ECNI)-MS Inyector split/splitless Modo splitless	DB-5MS, 15m x 0,25mm i.d. x 0,1 µm.	81 – 93 % MDL: 0,02 – 5,8 pg/m <sup>3</sup>	Recuperacione s medias de los surrogates	W. Ma 2017
7 compuestos	OPs	Aire: PUF-PAS Suelo	Soxhlet Diclorometano/hex ano (1:1, v/v)	SPE Florisil	GC-(E)-MS Inyector split/splitless Modo splitless	DB-5MS, 30m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm.	65 – 108 % IS >80 % target LOD: 30 – 116 pg/m <sup>3</sup> 0,15-4,3 ng/g (suelo)		P. Kurt-Karakus 2018
15 PBDEs (BDE-209) 11 NBFRs (non-PBDEs) 2 DPps	BFRs CFRs PFRs	Aire: GFF PUF	GFF: Ultrasonidos x 3 Diclorometano PUF: Soxhlet Éter de petróleo/acetona (85:15, v/v)	NA	GC-MS Inyector split/splitless Modo splitless Ionización: BFRs, CFRs, PFRs: DB-5MS, 30m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm. TDCPP: NCI PFRs: EI	BFRs y CFRs: DB-5MS, 15m x 0,25mm i.d. x 0,1 µm. PFRs: DB-5MS, 30m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm.	89 – 137 % MDL (pg/m <sup>3</sup> ): PUF (BFRs): 0,04 – 1,36 GFF: (BFRs, CFRs) 0,03 – 1,44 (PFRs) 3 – 87		M. Shoeb 2014
20 PBDEs 10 DPps + derivados 9 NBFRs (non-PBDEs)	HFRs	Pescado	ASE Diclorometano	GPC + SPE sílica	GC-(ECNI)-MS Inyector split/splitless Modo pulsed-splitless	DB-5MS, 15m x 0,25mm i.d. x 0,1 µm.	78 – 104 % 0,5 – 3,5 ng/g i.w.	Con el 10% del extracto del ASE, se obtiene el contenido de grasa.	M. Widelka 2016
8 PBDEs 9 OPFRs	FRs OPFRs	Poivo Aire: PUF-GFF	ASE n-hexano/Acetona (1:1, v/v)	SPE 1: sílica neutra, alúmina neutra y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anh. SPE 2: Solo para polvo (PBDEs) Strata FL-PR. (OPFRs) Envi-Carb	GC-(E)-MS/MS Inyector PTV Modo splitless GC-MS solo para BDE-209 Inyector split/splitless Modo splitless	DB-5MS, 30m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm. DB-5MS, 10m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm.	78 – 130 % LC: 0,20 – 1000 ng/g polvo. 0,8 – 290 pg/m <sup>3</sup> en aire.	Recuperacione s medias de los patrones internos	C. He 2018

Compuestos	Grupo	Matriz	Extracción	Purificación	Instrumental	Columna analítica	R (%) / Límites	Comentarios	Ref.
PBDEs HBCDDs NBFRs	BFRs	Aire: GFF PUF	PUF y GFF (indoor): Ultrasonidos DCM x2 PUF y GFF (outdoor): Soxhlet DCM	Purificación 1: SPE sílica desactivada → 3 fracciones. F1: hexano F2: dietiléter/hexano (5:95, v/v) F3: dietiléter/hexano (50:50, v/v) Purificación 2: F1 y F3 → Trat. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> F2 → SPE aminopropil	GC-(ECNI)-MS Injector split/splitless Modo pulsed-splitless  HBCDDs UHPLC-MS/MS	PBDEs y NBFRs: HT-5, 15m x 0,25mm i.d. x 0,1 µm. HT-5, 30m x 0,25mm i.d. x 0,1 µm. HBCDDs: HSS C18 (100 x2,1 mm, 1,8µm)	ML (pg/m <sup>3</sup> ) Outdoor-PUF: 0,012 – 2,4 Outdoor: GFF 0,0047 – 3,3 Indoor: PUF 0,8 – 470 Indoor: GFF 0,8– 500		S. Newton 2015
11 compuestos	PFRs	Pescado	- Soxhlet DCM. - Cambio de disolvente a MeOH.	- Congelar extracto y desechar lípidos. - LLE (5%MeOH en agua). - SPE (Oasis HLB) - d-SPE: Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + Z-Sep/C18 (1:1) - Alternativa: GPC+SPE multicapa	GC-MS Injector split/splitless Modo splitless	DB-5MS, 30m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm	Metodo propuesto: 56 – 108 % Alternat. GPC: 19 – 121 % MDL (ng/g): 0,004 – 0,059 MLL (ng/g): 0,027– 0,55	Las muestras son liofilizadas. Con el 10% del extracto se obtiene el contenido lipídico + gravimetría del lípidos desechados.	Y. Liu 2018
PCBs indicadores PCB-118 similar 27 OCPs Piretroides 9 PBDEs 17 NBFRs 3 deodoranos	PCBs  Plaguicidas PBDEs NFRs	Leche materna  Polvo	PLE (Buchi) Hexano:DCM :MeOH (5:2:1)	1. GPC con DCM. 2. Extracto evaporado + ACN → congelador → Filtrar lípidos suspendidos en congelador. Repetir el proceso 2 veces. 3. Dialisis. 4. Columna SPE: C18, alumina básica activa	GC-(EI+)-HRMS (sector magnético) Injector split/splitless Modo splitless Resolución ≥ 10000	Pre-columna Rxi-desactivada 0,6m x 0,56 µm 1. PCBs, OCPs: SGE HT8, 60m x 0,25mm x 0,25 µm. 2. Piretroides: DB-5MS UI, 60m x 0,25mm x 0,25 µm. 3 y 4. PBDEs, NFRs: Rtx-1614, 15m x 0,25mm x 0,1 µm.	OCPs, PCBs, PBDEs: 81 – 121 %  Pretroides y NFRs: 58 – 120 % 40 – 121 % Respectivamente.	Las muestras son liofilizadas. Contenido lípidos → gravimetría 4 métodos con distitas condiciones cromatogr. Selecciona entre distintas etapas de purificación: GPC + FLF + SPE o Dialisis + SPE.	E. Čechová 2017
8 PBDEs 3HBCDDs 16 EFRs	FRs	Comida Leche materna  Aire Polvo	ASE Hexano : Acetona (3:1, v/v)	Celdas ASE con Florisil y alumina. Tratamiento ácido con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .	GC-(ECNI)-MS PTV Para HBCDDs: LC-MS/MS	TG-SQC, 15m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm.. XRS3 C18(150 mm x 2 mm, 3 µm)	LOQ (ng/g peso seco): 0,003 – 0,25. Curva (ng/ml): 25–500, 50 – 1000 (BDE-209, DBDPE.	Muestras liofilizadas. R(%) = 83 – 95 de los IS	F. Tao 2017 F. Tao 2016

Compuestos	Grupo	Matriz	Extracción	Purificación	Instrumental	Columna analítica	R (%) / Límites	Comentarios	Ref.
8 PBDEs 3 NBFRs	BFRs	Pescado marisco	ASE hexano:DCM (1:1, v/v)	SPE cartuchos Al-N.	GC-(EI)-MS/MS (IT). Inyector split/splitless Modo splitless	ZB-5, 15m x 0,25mm i.d. x 0,1 µm.	iLOQ = 10 - 50 ng/ml	Muestras liofilizadas. Contenido lipídico por gravimetría.	L. Trabolón 2017
8 compuestos	OPFRs	Pescado	ASE Agua (10%ACN) 2g sílica gel lavada con ácido.	Simultánea con la extracción. 10 mL del extracto.	SPME (fibra de PDMS/DVB) GC-FPD Inyector split/splitless	HP-5, 30m x 0,32mm i.d. x 0,25µm.	LODs ng/g (l.w.) = 0,010 - 0,208 Lineal (ng/g): 0,9-5000 R=76-102% (50 y 500 ng/g)		Z. Gao 2014
16 compuestos	OPFRs y plastificantes	Pescado	Ultrasonidos x2 Acetona:Hexano (1:1, v/v)	SPE tandem: Alúmina básica + C18.	LC-QqLIT-MS ESI+	Purosphere Star RP-18 (125mm x 2,0 mm, 5µm). Precolumna C18 (4 x 2 mm).	MDLs (ng/g) (l.w.) = 0,34 - 51,6 MQLs (ng/g) (l.w.) = 1,12-172 R=45-115%	Muestras liofilizadas	G. Santín 2016
13 OPES	OPES	biota	SPE dispersiva (NaCl, MgSO <sub>4</sub> ), DCM:hexano (1:1) + ultrasonidos x2. Evaporación y ultrasonidos (MeOH)	SPE dispersiva (PSA)	UHPLC-(APCI+)-MS/MS	Waters Cortecs™ UPLC C18 column (50 x 2,1 mm, 1,6 µm) acoplada a columna in-line filter-kit ACQUITY UPLC	R = 54-104% MQL (ng/g) = 0,05-0,50	Precauciones a tomar con material utilizado para eliminar impurezas	S. Chu 2015
8 PBDEs 4EFRs 8PFRs	HFRs PFRs	Alimentos (Carné, pescado, moluscos, huevos)	Extracción asistida por ultrasonidos y vacío (UVAE): Metanol:tolueno (9:1, v/v) + sonicar + SPE (1g, MgSO <sub>4</sub> ) con vacío.	1. SPE florisil: F1 (Hexano) F2 (ACN) 2. F1: SPE sílica acid. 10%. F2: d-SEP, DSC18/Z-3. F1+F2=F3, SPE, ASP: F4: PBDEs y EFRs, F5: PFRs	F4: GC-(ECNI)-MS Inyección con PTV F5: GC-EI-MS Inyección con PTV	DB-5, 15m x 0,25mm i.d. x 0,1 µm. HT-8, 25m x 0,22mm i.d. 0,25µm.	R = 75- 135% MQL (ng/g d.w.) = 0,008 - 0,4 R = 66 - 112% MQL (ng/g d.w.) = 1,4 - 3,6	Determinación del contenido lipídico. Muestras liofilizadas.	F. Xu 2015

Compuestos	Grupo	Matriz	Extracción	Purificación	Instrumental	Columna analítica	R (%) / Límites	Comentarios	Ref.
PBDEs 8 derivados metoxilados 15 BFRs emergentes	BFRs	Huevos de águila Grasa de foca Pescado	Añadir N <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> prop. 1:10. Extracción lipídica con hexano:DCM (1:1,v/v)	Columna sílica multicapaa.	GC-(APCI)- MS/MS Inyección splitless	Rx-1614, 15m x 0,25mm x 0,1 µm.	R = 44-131% 24-111% (IS) MDLs (pg/µl) = 1,4-24,0	Recuperacione s de los patrones internos.	D. Geng 2017
6 compuestos	PBDEs	Pescado	UAE Solu.c.ac. (25% hidroxid. tetrametil amonio) Solución tampón tris-citrato+iso- octano. Agitación.	SPE Florisil	GC-ICP-MS Inyección splitless	DB-5MS, 15m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm.	MDL (ng/g dw) = 0,038 – 0,105 R = 94 – 105%		P. Novak 2017
8 ftalatos 4 OPEs	Phtalatos OPEs	Aire: QFF (PM10)	PLE (ASE) DCM:EtAc (1:1, v/v)		GC-EI-MS Inyector split/splitless Modo splitless	ZB-5, 30m x 0,25mm i.d. x 0,25µm.	MDL (ng/m <sup>3</sup> ) = 0,004 – 0,4 MQL (ng/m <sup>3</sup> ) = 0,04 – 2,0 R = 90 -110 %		M. Aragón 2012
3 HBCDDs TBBPA	BFRs	Leche materna	Soxhlet (Hexano:acetona) (1:1, v/v)	GPC (EtAc : ciclohexano, 1:1) + Tratam. Ácido	UPLC-MS/MS GC-ECNI-MS Inyección split/splitless Modo splitless	BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7µm) DB-5MS, 15m x 0,25mm i.d. x 0,1 µm.	MDL (pg/g) = 2,3 - 60 R = 75-125%	Muestras liofilizadas. Contenido lipídico por gravimetría.	Z. Shi 2013
32 PCBs 17 OCPS 9 BFRs	PCBs BFRs OCPS	Grasa de pescado	Ultrasonidos x2 Acetona:Hexano	1. ACN-congelar- separa fases- eliminar grasa. Filtrar lana de vidrio y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anh. x 3. 2. GpC (DCM). 3. SPE sílica LC-Si	PCBS-OCPS GC-(EI)-MS Inyección splitless BFRs GC-(ECNI)-MS Inyección splitless	DB-5, 30m x 0,25mm i.d. x 0,25 µm DB-5HT, 15m x 0,25mm x 0,1µm	R=27,8-145,4%	Recupera- ciones de los patrones internos.	J.P. Desforges 2017
12 PBDEs 3 HBCDDs 10 otros BFRs	BFRs	pescado	Soxtec DCM:Hexano, (1:1, v/v)	1. GPC (ciclohexano :acetato de etilo). 2. Columnas de sílica ácida en modificada en serie.	HPLC-APPI- QOrbitrap-MS	Kinetex RP- C18, 100 x 2,1mm, 2,6 µm.	MQL = 0,001 – 0,25 ng/g (w.w). R (0,125 ng/g)= 80 – 119%	Muestras liofilizadas	D. Zacs 2015

Compuestos	Grupo	Matriz	Extracción	Purificación	Instrumental	Columna analítica	R (%) / Límites	Comentarios	Ref.
8 OCPs 12 PCBs 11 PBDEs	OHPs	Leche materna	ELL x 3 con Hexano-ACN-Etanol	Filtrar por Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Mini-columna (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + Florisil)	OCPs y PCBs: GC-(ECD) Injector splitless. PBDEs: GC-ENCI-MS Inyección splitless	Cuant/ PTE-5, 30m x 0,32mm x 0,32µm. Comf/HP-1, 30m x 0,32mm x 0,25µm. HP-5MS, 30m x 0,25mm x 0,25µm.	OCPs=PCBs: R= 79 -100%. LOD (ng/g l.w) = 0,5 - 1. PBDEs: R = 81 - 97%. LOD (pg/g l.w) = 57 - 695.	Contenido lipídico por gravimetría.	Hassine 2012
15 OPFRs siloxanos	OPFRs Siloxanos	Pescado	PLE (ASE) Tierra de diatomeas DCM:Hexano	Cartucho de vidrio Supelclean (Isolute + sílica aminopropil)	LC-(ESI+)-MS/MS	Symmetry C18, 100mm x 2,1mm, 3,5 µm.	MQL (ng/g ww)= 0,05 - 0,49. Rmedia IS = 101%		McGoldrick 2014
PBDEs Declorane plus	BFRs	Aire (GFF)	Soxhlet Hexano:acetona (1:1, v/v)	Columna multicapa sílica/alúmina:	GC-(NCl)-MS Inyección splitless	(Octa-, nona-, Deca-BDEs y DP): DB-5HT, 15m x 0,25mm x 0,1µm. (Hasta hepta-BDEs): HP-5MS, 30m x 0,25mm x 0,25µm.	R <sub>m</sub> DP= 102%. R <sub>m</sub> Congeneres PBDEs) = 90%	LOQ > 10 S/N	Yu 2011
PBDEs		Aire: PUF, GFF, polvo	Soxhlet DCM	1. Trat. ácido. 2. GPC	GC-MS	DB-5, 15m x 0,25mm x 0,1µm.	R = 80-91%		Li 2015
24 compuestos	PFCs y sus precursores	pescado	ESL por ultrasonidos enfocado (FUSLE) ACN:agua (9:1, v/v)	SPE (WAX) in-line acoplada a Carbon grafitizado Envi-Carb)	LC-(ESI-)-MS/MS	ACE UltraCor 2.5 SuperC18, 50mm x 2,1mm, 2,5 µm.	LOQ = 0,005 - 2,34 ng/ml. MDL (ng/g) = 0,1 - 4,1. R(25ng/g) = 66 - 108%	Muestras liofilizadas	I. Zabaleta 2015
15 OPFRs	OPFRs	Pescado Carne	MAE 130 °C, 20 min. 10 mL Acetona:Hexano (1:1, v/v)	1) GPC: Bio-Beads (Hx:DCM, 7:3, v/v) 2) SPE: Acetona:Hexano (1:1, v/v) gel	GC-(EI)-MS Modo SIM Injector split/splitless. Modo splitless.	DB-5MS, 30m x 0,25mm x 0,25µm.	MDL (ng/g l.w) = 0,006-0,021. MQL (ng/g l.w) = 0,0198-0,0693. R=71,5-91,5%, except TMP (39%).		W. Ma 2013



Compuestos	Grupo	Matriz	Extracción	Purificación	Instrumental	Columna analítica	R (%) / Límites	Comentarios	Ref.
PAHs Pesticidas PCBs PBDEs PPCPs	Contami- nantes ambien- tales	Leche materna pescado	QuEChERS (4 g MgSO <sub>4</sub> , 1 g NaCl)	1. Congelación (precipitar y eliminar lípidos). 2a. Para compuestos polares: Dilución con ACN (0,1%) ac fórmico) - Filtrar con cartuchos de lípidos Captiva ND . 2b. Compuestos apolares: d-SPE (MgSO <sub>4</sub> + Z-Sep) + filtro PTFE	Cptos Polares: LC-QTOF- MS/MS ESI-  ESI+  Cptos semi- /no polares: GC-El-MS/MS Injector PTV, modo splitless	- XDB-C18, 50mm x 2,1mm, 1,8 µm. - XDB-C18, 100mm x 2,1mm, 1,8 µm.  - DB-5MS, 30m x 0,25mm x 0,25µm.	Leche materna: polares: MQL (ng/g) = 0,3- 8,9 R = 60-114%. No- polares: MQL (ng/g) = 0,14-5 R=61-124%. Pescado-polares: MQL (ng/g) = 0,2- 5,4. R = 45-128%. No-polares: MQL (ng/g) = 0,08-2. R = 61-115%.		Baduel 2015
13 PFCAAs 3 PFASAs	PFAS	anguila	Ultrasonidos (ACN)	SPE: Oasis-WAX con vacío	HPLC-(ESI)- Qorbitrap- HRMS	Synergi Hydro- RP, 150X 2,0mm, 4µm. Pre-columna C18, 4 x 3mm	LOD (pg/g) = 5- 35. R = 80-117%	Muestras liofiliz. Mega-bond WR C18, 5cmx4,6m m, 10µm.) entre bomba- iny.	Chiesa 2018
25 PFASs 11 BFRs	PFASs HCS	pescado	QuEChERS: Agua, ácido fórmico, ACN, MgSO <sub>4</sub> , NaCl	d-SPE: MgSO <sub>4</sub> , sílica C18. Filtrar a través de filtro nylon 0,2µm.	UHPLC-(ESI)- MS/MS	- HSS T3, 100mm x 2,1mm, 1,8µm. - Atlantis T3 50mmx2,1mm, 5µm.) entre bomba e iny.	PFAS: R=86-107% MQL (ng/g ww) = 0,001 - 0,01 BFRs: R=79-104% MQL (ng/g ww) = 0,003 - 0,3		Svihli- kova 2015
14 PFCAAs 6 PFASAs	PFASs	Leche materna Leche de fórmula Aliment os infantiles	Digestión alcalina (NaOH) + dilución	SPE: Strata-X, fase reversa polimérica 33µm.	LC-(ESI)- MS/MS	Kinetex 1.7V- C18, 50mm x 2,1mm, 5µm.	Leche materna y de fórmula: LOQ (ng/L) = 0,5-2 R(LOQ)=70-120% Alim. Infant. : LOQ (ng/g) = 3,75-15. R(LOQ) = 72- 105%		M. Lorenzo 2016
22 compuestos	PFASs	Pescado	Ultrasonidos (metanol)	SPE: Strata X-AW + cartuchos grafito Envi-Carb	LC-(ESI)- MS/MS	Zorbax Eclipse Plus C18, 100mm x 2,1mm, 1,8 µm.			Babut 2017

Compuestos	Grupo	Matriz	Extracción	Purificación	Instrumental	Columna analítica	R (%) / Límites	Comentarios	Ref.
10 PFCAs 4 PFASs	PFASs	Leche materna	LLE: Ultrasonidos- Acetona	SPE: Oasis HLB + Envi-carb	HPLC-(ESI-)- OrbitrapMS	Gemini C18, 50mm x 2,0mm, 3µm.	R <sub>ess</sub> (250pg/ml) ) = 38-105% MDL(pg/ml)= 1-50.		Kadar 2011
8 PFCAs 3 PFSAa	PFASs	Solidas ambien- tales: moluscos, yema, sedimento y pescado	Aqua:ACN (10:90, v/v) + ácido fórmico. Agitación+ Ultrasonidos x3	d-SPE: MgSO <sub>4</sub> , NaCl. Filtrar e traves cartucho HybridSPE.	On-line TFC- UHPLC-MS/MS	Fluoro XL, 50 x 0,5mm + Cyclone, 50 x 0,5mm Hypersil GOLD PFP, 50 x 2,1mm, 1,9µm (entre bombo e inyector)	MQL (ng/g ww) = 0,1- 0,9 R(PFCAs)= 98-133%. R(PFSAa) = 40-60%.		Mazzoni 2016
11 PFCAs 5 PFASs PFOSA PFOSI	PFASs	Suero materno y del cordón. Leche materna	Sueros: Digestión alcalina (KOH). Leche materna: Precipit. Proteínas (acetona)	SPE: Oasis HLB + carbóno- grafitado Envi-Carb	LC-(ESI-)- MS/MS	Gemini C18, 50mm x 2,0mm, 3µm. Pre-columnna, 50 x 2,0mm, 3µm	Sueros: LOQ (ng/ml)= 0,3-0,4. Leche materna: LOQ (ng/ml)= 0,03-0,1 R=70-100%		Carrou 2015
PFOA PFOS	PFASs	Pescado	Digestion: NaOH, Metanol.	SPE: Oasis WAX	LC-(ESI-)- MS/MS	Synergi Fusion, 150x2mm, 4µm. Pre-columnna, 4,0x2,0mm.	PFOA: LOQ= 0,5 µg/kg. R=99-109% PFOS: LOQ = 0,7µg/kg. R=95-108%		Ciccotelli 2016
10 PFCAs 5 PFASs	PFAS	pescado	ESL (Metanol)	SPE: carbóno grafitado	LC-(ESI-)- MS/MS		LOD=0,005- 0,95 ng/g	Muestras liofilizadas.	A. Yamada 2014
8 PBDEs 8 NBFRs	BFRs	Aliment.: pescado	PLE (Buchi), tolueno : acetona (70:30, v/v)	Columnas multicapta: silica neutra y ácida. SPE: florisil+ carbon	1. GC-EL-HRMS x 2(a y b). Inyección splitless 2. GC-(APCI+)- MS/MS a. Inyección splitless (pulsed) b. Inyección pulsed split.	1a. PBDEs: DB-5MS, 30m x 0,25mm x 0,25µm. 1 b. BDE209, OBIND: RTX-1614, 15m x 0,25mmx0,1µm 2. (0,1µm) a. Optim-5HT, 15m x 0,25mm. b. Optima 5, 2,5mmx0,1mm	LOQ(pg/g)= 1 - 250	Muestras liofilizadas	Bichon 2016

Compuestos	Grupo	Matriz	Extracción	Purificación	Instrumental	Columna analítica	R (%) / Límites	Comentarios	Ref.
9 PFCAs 3 PFSAs PFOSA	PFASs	Pescado	SLE (Metanol, agua y NaOH o KOH)	Dilución con agua. SPE: cartuchos de intercambio aniónico débil.	HPLC-(ESI)-MS/MS	A. C18 RP, 10cm x 2,1mm, 3.5µm. B. C18 RP, 10cmx3mm, 3µm.	A. MDLS (ng/g) = 1,25-1,45. B. MDLS (ng/g) = 0,06-0,12. Recuperación media IS = 50%		Stahl 2014
9 PFCAs 5 PFSAs	PFASs	Leche materna	Precipit. Proteínas (acetona).	SPE1: Oasis HLB SPE2: C grafit. Envi-Carb	UHPLC-(ESI)-(LTQ-Orbitrap)-HRMS	Gemini C18, 50mm x 2,0mm, 3µm. Precolumna, 10mm x 2mm, 3µm.	MDLS (ng/ml) = 0,05-0,1.		Antignac 2013
6 PFCAs	PFASs	Leche materna	Extracción de par-iónico (TBA, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , MTBE)	Filtro Nylon, 0,2µm. Esterificación-derivatización	GC-(EI)-MS Inyección splitless	DB-35MS, 30m x 0,25mmx0,2µm	LOQ (ng/µl) = 10-15. Rm=97%		Motas 2016
6 PFCAs 2 PFSAs	PFASs	Aire (PM2,5)	SLE (Metanol); Ultrasonidos x3	Filtrar Acrodisc, 0,2µm	HPLC-(ESI)-MS/MS	Kromasil C18, 250 x 4,6mm.	LOD (ng/µl) = 0,08-2,89. R = 80-114%		Guo 2018
A: 10 PFASs neutros y 17 PFASs iónicos (PFCAs y PFSAs) B: 2 PFASs neutros y 10 PFAS iónicos (PFCAs y PFSAs)	PFASs	Aire: GFF PUF/XAD-2/PUF	A. Neutros : PLE (ASE): n-hexano 2. Iónicos: PLE (ASE): metanol B. Ultrasonización (metanol) x3	B. Tratamiento ácido.	A. Neutros: GC-(PCD)-MS 2. Iónicos: UPLC-ESI(-)-MS/MS B. UPLC-(Z-ESI)-TOF-MS	A. DB-WAX (30m x 0,25mm x 0,25µm). B. Cortecs C18, 50x2,1mm, 1,6µm.	1. R=65-109%, excepto 6:2FTOH(29%). MDLS (pg m <sup>-3</sup> ) = 0,008-1,8. 2. R=71-99%. MDLS (pg m <sup>-3</sup> ) = 0,008-0,79.	A: Dilución isotópica. Recuperacionespa trones internos.	Wong 2018
19 PBDEs: triBDEs - heptaBDEs	PBDEs	Leche materna	Desnaturaliz. proteínica: (ácido fórmico)	SPE: 1. Cartuchos C18 Sep-Pack Vac - NH <sub>2</sub> Sep-Pack plus. 2. Cartuchos sílica/florisil	HRGC/HRMS	DB-5M, 15m x 0,25mmx0,1µm	R= 80-93%. LOQ = 0,03-0,13 ng/g l.w.	Dilución isotópica. Recuperac. medias de los patrones internos. Cont. Lipídico mediante gravimetría (ELL).	Lee 2013

Compuestos	Grupo	Matriz	Extracción	Purificación	Instrumental	Columna analítica	R (%) / Límites	Comentarios	Ref.
7 compuestos	PBDES	Leche materna	ELL: 1. ácido hidroclorídrico + isopropanol. 2. Hexano:MTBE (1:1, v/v) x2	Trat. Ácido (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) + columna sílica acidificada.	GC-ECNI-MS		R (IS)=89% LOD=0,1-0,5 ng/g l.w.	Calculo del contenido lipídico mediante gravimetría.	Cui 2012
19 PFASs 3 HBCDDs TBPPA 4 OH-BDES 3 Br-PhOHs	PFASs BFRs y metabólitos	Leche materna Leche de fórmula	QUECHERS; ác. Fórmico+ ACN + MgSO <sub>4</sub> +NaCl	d-SPE: C18+MgSO <sub>4</sub> Filtrar por filtro de nylon 0,22 µm.	UHPLC-(ESI)-MS/MS	HSS T3, 100x2,1mm, 1,8 µm. Pre-columna entre bomba e iny. (50x2,1mm)	Lmaterna: LOQ (pg/ml)=3-200. R=80-111% L. form.: LOQ (pg/g)=5-450. R=81-117%	Calculo del contenido lipídico por gravimetría (ELL).	Lankova 2013
7PBDES 6PCBs	PBDES PCBs indicados	Leche materna	PLE (ASE) hexano:DCM (1:1,v/v).	SPE automático (PowerPrep)	GC-(EI)-HRMS (DFS sector magnético)	PBDES: DB-5 HT (15m x 0,25mm x 0,10µm). PCBs: DB-5 MS (60m x 0,25mm x 0,25µm).	PBDES: MDL(pg/g l.w.) =0,3-1,8. R <sub>IS</sub> =44-98% PCBs: MDL(pg/g l.w.) = 0,3-2,2. R <sub>IS</sub> =50-94%	Muestras liofilizadas. Contenido lipídico por gravimetría.	Zhang 2017
19PBDES 15PCBs	PBDES PCBs	Leche materna	PLE (ASE)	GPC (DCM)	GC-(EI)-HRMS (DFS sector magnético)	PBDES: DB-5MS (15m x 0,25mm x 0,10µm). PCBs: HT8-PCB (60m x 0,25mm x 0,25µm).	R (SRM195)= 98% (BDE-47) y 113% (PCB-153).	Muestras liofilizadas. Dilución isotópica. Contenido lipídico por gravimetría.	Guo 2016
PBDES HBCDDs PCBs	BFRs PCBs	Leche materna	Homogeneizar con N <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . LLE acetona:hexano (1:1, v/v)	GPC DCM:hexano (1:1, v/v) SPE:columna vidrio, sílica activada.	PCBs y PBDES: GC-MS HBCDDs: LC-MS/MS	PCBs y PBDES: a. DB-1, 30m x 0,25mm x 0,25µm. b. DB-1, 15m x 0,25mm x 0,10µm.	R <sub>IS</sub> (PCBs)= 69-112%. R <sub>IS</sub> (PBDES)=82-109%. R <sub>IS</sub> (HBCDDs)= 101-110%. LOD(ng/g l.w)=0,01-0,05.	Muestras liofilizadas. Contenido lipídico por gravimetría. Diución isotópica.	Devanathan 2012
5PBDES 2DPS	PBDES Declorane plus	Leche materna	LLE DCM:Hexano, (1:1, v/v) x3	Filtrar por lana de vidrio + Whatman 13mm. GPC	GC-(ECNI)-MS/MS (modo SIM) Inyección splitless pulsada	DB-1 MS, 15m x 0,25mm x 0,25µm.	R <sub>IS</sub> = 52-101%. MDL (ng/g l.w) =0,05-4,5	Contenido lipídico por gravimetría.	Siddique 2012

R (%): Recuperación

MDL: Límite de detección del método

LOD/LD: Límite de detección

ML: Límite de cuantificación del método

LC/LOQ (ILOQ): Límite de cuantificación (Límite de cuantificación instrumental)

En primer lugar, se necesita una primera etapa de extracción. Ésta puede incluir o no, dependiendo de la matriz, una fase de desnaturalización proteínica (Cariou et al. 2015) o de digestión alcalina (leche materna y pescado) (Lorenzo et al. 2016; Ciccotelli et al. 2016). El uso de disolventes orgánicos es clave para conseguir una óptima extracción de sustancias con cierto comportamiento apolar. Y aunque la tendencia actual es la de reducir el consumo de dichos disolventes orgánicos, además de reducir también el tiempo de análisis, aún se siguen utilizando técnicas de extracción convencionales con un elevado consumo de disolvente, como son la técnica Soxhlet (Bossi et al. 2016; Liu et al. 2018; Shi et al. 2013), la extracción sólido-líquido (Deng et al. 2018) o la extracción líquido-líquido (Cui et al. 2012; Siddique et al. 2012). Esto es debido a su sencillez y disponibilidad en la mayoría de laboratorios. Sin embargo, cada vez se simplifican más las etapas de extracción intentando evitar pasos como la digestión o precipitación de proteínas, y se observa claramente un aumento en el uso de técnicas basadas en asistir o acelerar la extracción para conseguir una mayor rapidez y reducir el volumen de disolventes orgánicos. Algunas de estas nuevas técnicas incluyen la extracción con disolvente presurizado (PLE, o extracción acelerada con disolvente, ASE) (Trabalón et al. 2017; He et al. 2018; Čechová et al. 2017), la extracción asistida con microondas (MAE) (Berton et al. 2016; Ma et al. 2013), o la extracción asistida con ultrasonidos (UAE) (Dreyer et al. 2015; Santín et al. 2016). Modificando la presión y la temperatura, en el caso de la PLE, o la temperatura junto con la energía de microondas o ultrasonidos, en el caso de MAE o UAE, se consigue disminuir la viscosidad del disolvente aumentando la transferencia de masa desde la muestra al disolvente. Su eficacia, junto con su excelente rapidez y su menor consumo de disolvente hace que sean las técnicas “verdes” de extracción más utilizadas para el análisis de contaminantes orgánicos, especialmente para los de más baja polaridad (Berton et al. 2016). Sin embargo, con éstas técnicas, y especialmente con la PLE, se da un aumento considerable y no deseado en la coextracción de lípidos de la matriz, lo que lleva a etapas adicionales de purificación, a multi-etapas de evaporación, y consecuentemente, a una disminución en las recuperaciones. Una técnica que ha cobrado relevancia en los últimos años es la metodología QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), la cual ha tomado gran importancia debido a la reducción del consumo de disolvente, del tiempo de

análisis y a la versatilidad que presenta dicha metodología en cuanto a su aplicabilidad a todo tipo de matrices, sólidas o líquidas, desde más acuosas a más grasas, y para todo tipo de sustancias, abarcando un amplio abanico de polaridades de diferentes contaminantes, plaguicidas, etc. Esta técnica de preparación fue desarrollada originalmente para la extracción de pesticidas en frutas y hortalizas. Consta de dos etapas: una primera de extracción con dos disolventes miscibles (agua y acetonitrilo) con altas concentraciones de sales tales como cloruro de sodio, sulfato de magnesio (*salting-out*) y agentes tampón, y una segunda etapa de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) en la que una alícuota de la fase orgánica de la primera etapa se trata con diversos adsorbentes para eliminar los interferentes de la matriz que pudieran dificultar el posterior análisis instrumental. Se ha aplicado ampliamente para la detección de diferentes clases de sustancias tanto polares como no polares. Por ejemplo, esta metodología ha sido elegida por diversos autores para la determinación de contaminantes orgánicos como BFRs, PFAS, PCBs entre otros, en matrices de leche materna y ciertos alimentos como el pescado (Baduel et al. 2015; Svihlikova et al. 2015; Lankova et al. 2013).

En segundo lugar, se requiere, generalmente, de una o incluso dos etapas de purificación previa al análisis instrumental para conseguir así eliminar interferentes como los lípidos, para evitar problemas de sensibilidad, selectividad y sobre todo de reproducibilidad. Para el análisis de sustancias persistentes como los PBDEs, PCBs, o PFAS en matrices grasas (leche materna o pescados), o incluso en matrices medioambientales como filtros de aire, se han utilizado durante décadas técnicas de purificación destructivas como es el tratamiento ácido (Cui et al. 2012; Wong et al. 2018; Tao et al. 2016). Generalmente, el tratamiento ácido suele combinarse con otra etapa de purificación, como puede ser una extracción en fase sólida (SPE) (Newton et al. 2015), o una cromatografía preparativa como es la cromatografía de permeabilidad en gel (GPC) (Shi et al. 2013; Li et al. 2015). Sin embargo, el tratamiento ácido se limita exclusivamente a sustancias persistentes y resistentes a dicho tratamiento. Por tanto, queda descartado su uso para sustancias no persistentes. El GPC es una de las alternativas ampliamente utilizadas. Se trata de una cromatografía de exclusión por tamaños, en la que se utiliza como fase móvil disolvente orgánico, entre ellos la mezcla de acetato de etilo y ciclohexano en las

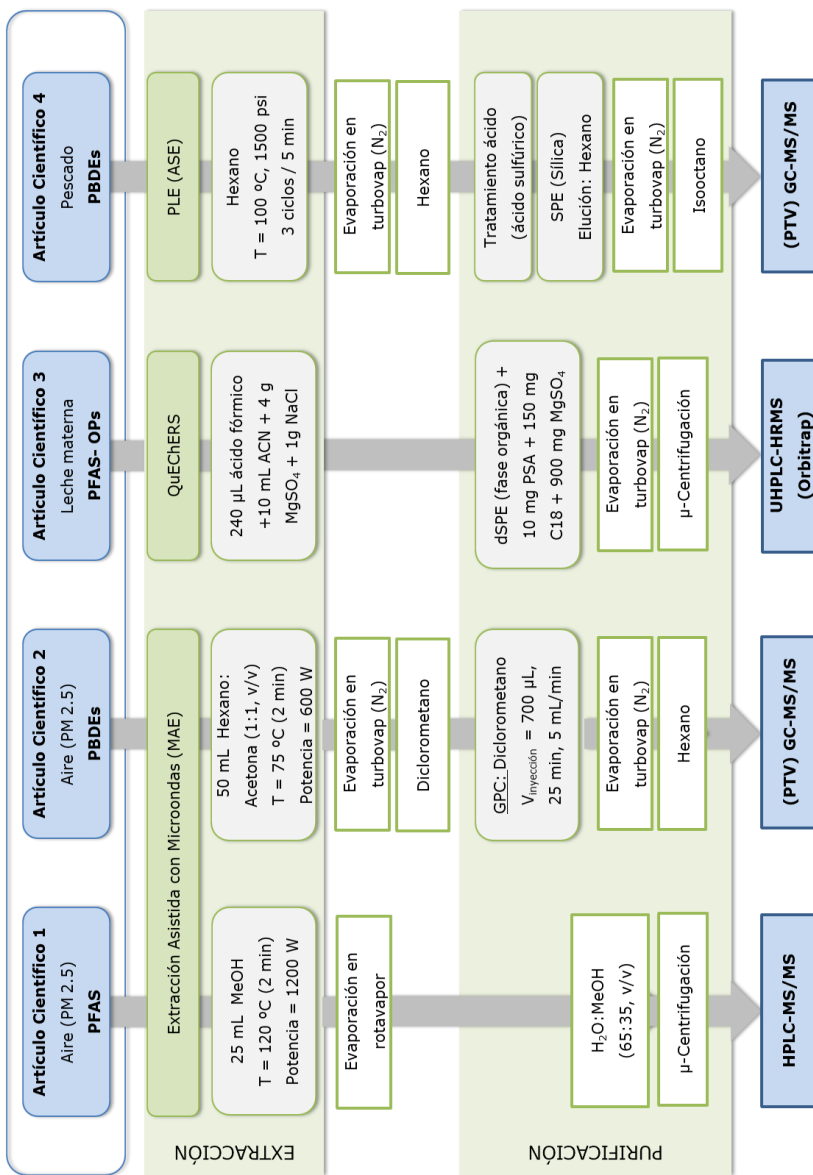
mismas proporciones, o el diclorometano, siendo este último el más común. Ésta técnica de purificación ha sido elegida por diferentes autores, tanto para el análisis de BFRs, como de PFRs en muestras de pescado (Ma et al. 2013; Widelka et al. 2016), de leche materna (Guo et al. 2016) y de aire (Li et al. 2015). Sin embargo, consume un elevado volumen de disolvente, y aunque es una técnica muy eficaz para eliminación de lípidos, en muchas ocasiones no es suficiente, y se requiere la utilización de otras técnicas de purificación.

La extracción en fase sólida, además de utilizarse como técnica de extracción para matrices líquidas, se usa frecuentemente como técnica de purificación en métodos multi-analito. Es la técnica más ampliamente utilizada, y generalmente, se combinan diferentes columnas o cartuchos de SPE para lograr eliminar todos los interferentes. En general se pueden distinguir tres tipos de SPE dependiendo del modo en que se carga y se extrae la muestra. En SPE clásico el extracto se aplica en el cartucho para retener los analitos de interés, se lava el cartucho para eliminar interferencias y se eluyen los compuestos de interés. Otra modalidad es la carga y recogida directa del cartucho quedándose retenidas las interferencias, y por último la extracción en fase sólida dispersiva (utilizada en la segunda etapa de la metodología QuEChERS). Las columnas más utilizadas durante décadas en el análisis de sustancias lipofílicas como los PBDEs o OPs en matrices complejas, han sido las de sílica gel (Qi et al. 2014), sílica gel multicapa (básica, neutra, ácida) (Geng et al. 2016), o sílica ácida a diferentes porcentajes de ácido, bien combinadas con otras técnicas como el GPC o el tratamiento ácido (Widelka et al. 2016; Newton et al. 2015), o bien con otras columnas o cartuchos como pueden ser las de alúmina (también multicapa) (Ding et al. 2016), de florisil (Bichon et al. 2016), o combinaciones entre otros sorbentes como C<sub>18</sub>, PSA, carbono grafitizado, HLB, etc. De hecho, los cartuchos más ampliamente utilizados para la determinación de PFAS en este tipo de matrices son los Oasis HLB (sorbente polimérico hidrofílico), los de carbono grafitizado y los cartuchos de intercambio aniónico débil combinándolos según las necesidades (Zabaleta et al. 2015; Antignac et al. 2013). Aunque cabe destacar que en los últimos años ha tomado importancia la SPE dispersiva con mezcla de sorbentes como C<sub>18</sub>, PSA, y carbono grafitizado, dependiendo dicha combinación y proporción del tipo de matriz y de analitos, y sales como el

Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y NaCl (Baduel et al. 2015; Svihlikova et al. 2015; Lankova et al. 2013). Una técnica sencilla y económica a mencionar es la congelación de lípidos o "*frozen-lipid filtration*" (FLF) que se utiliza en combinación con otras de las técnicas ya mencionadas y que consiste principalmente en dejar en congelación el extracto graso en un disolvente orgánico, de manera que es posible eliminar los restos lipídicos del extracto no graso (Čechová et al. 2017; Baduel et al. 2015).

En esta **Tesis Doctoral** se ha trabajado en el desarrollo de métodos de preparación y tratamientos de muestra actuales y automatizados, los cuales mejoran la reproducibilidad de los resultados. En la **Figura 9** se muestra un esquema de las estrategias seguidas, tanto en técnicas de preparación y tratamiento de muestra como de las técnicas instrumentales utilizadas en la presente **Tesis Doctoral**.





MeOH: Metanol; ACN: Acetonitrilo; dSPE: Extracción en fase sólida dispersiva; PSA: Amina primaria/secundaria; PLE/ASE: Extracción con disolvente presurizado/Extracción asistida con disolvente; SPE: Extracción en fase sólida.

**Figura 9.** Esquema de las estrategias de extracción, purificación y determinación seguidas en las diferentes metodologías optimizadas.

### 3.2. Técnicas instrumentales

La evolución de las técnicas instrumentales, tanto cromatográficas como de detección, ha sido considerable en las últimas décadas. Los detectores con los que estaban y todavía están equipados algunos cromatógrafos de gases, como el de captura de electrones (ECD), termoiónico (NPD), de ionización de llama (FID); y los detectores utilizados con cromatografía líquida, como el de fluorescencia (FLD), ultravioleta-visible (UV) o detector de ultravioleta-visible de diodos (DAD), aunque algunos de ellos son sensibles para sustancias específicas, no poseen la selectividad y sensibilidad que proporcionan los detectores de espectrometría de masas (MS), los cuales se han utilizado de forma más reciente para ambos tipos de cromatografía (Poole & Berezkin 2005). Las aplicaciones de MS en combinación con GC o LC han sido las técnicas utilizadas por excelencia en la última década para el análisis de contaminantes emergentes. Con el avance de la tecnología, la LC-MS ha ido sustituyendo poco a poco a la GC, pero únicamente para el análisis de compuestos menos volátiles, termolábiles o de polaridad moderada o alta. Por tanto, en la determinación de contaminantes emergentes, la elección del tipo de cromatografía depende de las propiedades físico-químicas del contaminante o familia de contaminantes. Por ejemplo, en la determinación de PBDEs en muestras alimentarias, ambientales o biológicas se hace uso de la cromatografía de gases (Bichon et al. 2016; Li et al. 2015; Cui et al. 2012), sin embargo, en la determinación de las sustancias alquil perfluoradas iónicas en este tipo de matrices se utiliza, claramente, la cromatografía líquida (Zabaleta et al. 2015; Dreyer et al. 2015; Lorenzo et al. 2016).

#### *Cromatografía de gases*

La cromatografía de gases es una de las técnicas analíticas más importantes para el análisis cualitativo y cuantitativo en un amplio rango de aplicaciones. En general, es la técnica cromatográfica por excelencia para el análisis de contaminantes orgánicos halogenados, como son los PBDEs o PCBs en muestras complejas. Se trata de una técnica ya consolidada, que combinada con otras técnicas como la detección espectrométrica, la introducción de muestra automatizada, o más recientemente la cromatografía multidimensional (GCxGC), ofrece una excelente sensibilidad, capacidad de pico y eficacia de separación. Ideal para análisis de

compuestos de baja polaridad a niveles de traza (Janssen et al. 2008), donde las técnicas de inyección y detección, junto con las características de la columna juegan un papel importante. En el caso de contaminantes emergentes, como son algunos de los BFRs (PBDEs), o los nuevos o alternativos BFRs, e incluso los OPs, en muestras de pescado, aire y leche materna, se ha encontrado que la cromatografía de gases se ha utilizado en un 97% de los estudios realizados para PBDEs y un 71% en los realizados para OPs, sin embargo, para el análisis de PFAS únicamente se ha utilizado la GC en un 6% de los estudios publicados. La cromatografía de gases, además, se ha utilizado en combinación con otras técnicas como la inyección de muestra mediante un sistema de vaporizador de temperatura programable (PTV), bien inyectando grandes volúmenes de muestra (Xu et al. 2015; Tao et al. 2017), o bien en su modo *split/splitless* (Möller et al. 2011; He et al. 2018).

En este sistema de inyección, la muestra es introducida a una temperatura baja en un inyector tipo *split/splitless* con ciertas modificaciones técnicas relativas al control de temperatura del mismo. Permite aplicar un programa de temperaturas en el sistema, de modo que la temperatura va aumentando gradualmente (generalmente calefacción balística). Si además se utiliza una velocidad de inyección controlada, lo suficiente baja para dar tiempo a que se evapore el disolvente, éste será eliminado correctamente por la válvula de *split*. La introducción de la muestra en un PTV puede llevarse a cabo mediante tres procesos diferentes:

- a) Una inyección (*at once*): Se refiere simplemente a una inyección rápida (1 - 2 segundos). Con este proceso se pueden inyectar volúmenes de hasta 100  $\mu\text{L}$  (mayor que con la inyección múltiple).
- b) Múltiple (*multiple injection*): La inyección con eliminación del disolvente se puede repetir varias veces para aumentar el volumen de muestra.
- c) Inyección de velocidad controlada (*Speed-controlled injection*): Si se dispone de un automuestrador de velocidad programable, una inyección múltiple se puede reemplazar por un proceso continuo, en el que la velocidad de inyección de la muestra puede ser controlado para igualarse a la velocidad de eliminación del disolvente. De este

modo, el volumen de inyección puede aumentar casi ilimitadamente (*very large volumes*).

A pesar de la posibilidad de inyectar volúmenes muy grandes con la técnica de inyección de velocidad controlada, es más común una sola inyección (*at once*) por su simplicidad.

Como ya se ha indicado, la técnica de detección por excelencia para el análisis de contaminantes emergentes en matrices alimentarias, ambientales y biológicas, es la espectrometría de masas. Dentro de sus múltiples posibilidades, en cuanto a ionización, analizadores y modos de trabajo, resaltar algunas de las fuentes de ionización y algunos de los analizadores de espectrometría de masas y su evolución para el análisis de este tipo de sustancias.

- *Fuentes de ionización*

La mayoría de los estudios realizados para el análisis de los BFRs u OPs analizados mediante cromatografía de gases con instrumentos de baja resolución (GC-MS o GC-MS/MS) utilizan como técnicas de ionización, la ionización de captura de electrones negativa (ECNI), la ionización electrónica (EI), y más recientemente, y con un gran impacto en los últimos años, la ionización química a presión atmosférica (APCI) (Shoeib et al. 2014; Geng et al. 2017). Tanto la ECNI como la APCI ofrecen gran sensibilidad si se comparan con la EI, sin embargo, la selectividad o especificidad al usar APCI o EI con fragmentación en MS/MS es mucho mayor que la obtenida al monitorizar, por ejemplo, los iones bromuro en ECNI (Sales et al. 2017). La APCI se caracteriza por ser una técnica de ionización suave, lo que resulta en una mayor abundancia del ión molecular o quasi-molecular, es decir, en una mayor abundancia del ión precursor y por tanto, se da un aumento de la sensibilidad y selectividad de los métodos MS/MS (Geng et al. 2017). Se trata de una técnica que ha dado resultados satisfactorios para el análisis de contaminantes halogenados como algunos BFRs, dioxinas, furanos y PCBs (Van Bavel et al. 2015; Portolés et al. 2015).

Si bien es cierto, que para la determinación de algunos BFRs, como los PBDEs, la mayoría de los estudios utilizan como fuente de ionización la ECNI (73%), siguiéndole la EI con un 18% de los artículos científicos encontrados. Sin embargo, en los últimos años se están utilizando también

la APCI, de momento utilizada en un 9% de los artículos que utilizan una GC acoplada a una espectrometría de masas de baja resolución.

- *Analizadores*

Siguiendo con la revisión bibliográfica realizada, dentro del análisis de sustancias emergentes como algunos retardantes de llama (PBDEs y OPs), los analizadores de espectrometría de masas más ampliamente utilizados dentro de la cromatografía de gases son el cuadrupolo simple y el triple cuadrupolo para analizadores de masa de baja resolución, y el sector magnético para los de alta resolución. El cuadrupolo simple presenta una resolución de masa unidad, se trata del analizador más sencillo dentro de los analizadores de masa. Selecciona y monitoriza diferentes iones característicos del compuesto o compuestos de interés. Por tanto, aun siendo uno de los analizadores menos selectivos, ha sido sin lugar a dudas, el analizador más utilizado para el análisis de retardantes de llama en muestras medioambientales (aire), biológicas (leche materna) y alimentarias (pescados) (Cui et al. 2012; Ma et al. 2013; Deng et al. 2018). Esto es debido, en primer lugar, a la posibilidad de combinarlo con la ionización química más específica de compuestos halogenados (ECNI), como por ejemplo los retardantes de llama bromados, y en segundo lugar, a su disponibilidad en, prácticamente, cualquier laboratorio analítico, debido a su extensa implantación y bajo coste. En cuanto al analizador de triple cuadrupolo, éste presenta diferentes modos de trabajo, siendo el modo "*selected reaction monitoring*" (SRM) o "*multiple reaction monitoring*" (MRM) el óptimo para la identificación y cuantificación de los analitos en un solo paso, con una elevada sensibilidad y selectividad. Básicamente, selecciona el ión característico del compuesto de interés en su primer cuadrupolo (ión precursor); en la celda de colisión este ion precursor es fragmentado mediante aceleración por un voltaje adecuado (energía de colisión) para generar los iones producto característicos del ión precursor; estos iones producto generados son transferidos al segundo cuadrupolo, donde se selecciona un  $m/z$  específico que será finalmente monitorizado. Este modo de trabajo reduce significativamente el ruido de fondo aumentando del mismo modo la selectividad. A pesar de las ventajas que presenta este analizador, se ha utilizado únicamente en un 20% de los artículos científicos encontrados (Zhu et al. 2018). Sin embargo, otro de los

modos de trabajo utilizado con este analizador para el análisis de retardantes de llama bromados es el “*selected ion monitoring*” (SIM) (Siddique et al. 2012), mismo modo de trabajo habitual del analizador simple cuadrupolo. La selección del modo SIM tiene que ver con el uso de la ionización química, ya que el ión característico de los compuestos bromados suele ser el  $\text{Br}^-$  ( $m/z$  79 y 81), el cual es difícilmente fragmentable, y que por tanto no tiene sentido hablar de  $\text{MS}^2$ . Sin embargo, el uso de esta combinación GC-ECNI-MS en modo SIM, requiere de la completa separación cromatográfica entre picos debido a su baja selectividad.

En cuanto a los analizadores de alta resolución (HRMS) acoplados a GC, hay que destacar el sector magnético, ya que ha sido clave desde hace ya años para el análisis dirigido de PCDD/Fs y PCBs (dioxinas) en muestras ambientales y de alimentos. En un analizador de sector magnético que presente una geometría inversa de Nier-Johnson, los iones atraviesan un campo magnético que actúa como separador antes de entrar en el sector eléctrico, el cual actúa como lente óptica iónica centrando y dirigiendo los iones hacia la rendija de salida (*exit slit*). Tanto la rendija de entrada (*entrance slit*) como la de salida son las que van a definir la resolución del HRMS (Thermo Fisher Scientific 2012). Este poder de resolución, que suele ser de 10.000 – 60.000 (100% *valley definition*) para el análisis dirigido de trazas, es el que le confiere a este equipo de su elevada especificidad. Esto junto con su también elevada sensibilidad hace que su uso se haya extendido para el análisis de contaminantes orgánicos a niveles ultra-traza en cualquier tipo de matriz (Bichon et al. 2016; Čechová, Seifertová, et al. 2017). De hecho, su uso está muy generalizado para el análisis de FRs. Se han encontrado estudios en los que se realiza la determinación de PBDEs en leche materna (Zhang et al. 2017), en aire ambiente (Bossi et al. 2016) y en alimentos como el pescado (Bichon et al. 2016), en los cuales los límites de cuantificación o detección son de uno a dos órdenes de magnitud inferiores a los de estudios en los que se utilizan espectrómetros de masa de baja resolución (Siddique et al. 2012; Ding et al. 2016). El hecho de que este analizador no sea el más utilizado para este tipo de análisis se debe principalmente a su elevado coste, lo que es una limitación para la mayoría de laboratorios analíticos.

Cabe mencionar también otros analizadores de HRMS, como el analizador de tiempo de vuelo (TOF), el acoplamiento cuadrupolo-tiempo de vuelo (QTOF), el Orbitrap y el acoplamiento cuadrupolo-orbitrap (QOrbitrap), todos ellos pueden encontrarse acoplados tanto a cromatografía de gases como a líquida, y todos ellos están enfocados, principalmente, para análisis no dirigido o búsqueda de desconocidos (Hernández et al. 2012).

En la presente **Tesis Doctoral** se ha demostrado la aplicabilidad del analizador de masas triple cuadrupolo acoplado tanto a cromatografía de gases como a líquida, además del Orbitrap como analizador de HRMS acoplado a cromatografía líquida, el cual se explica con más detalle más adelante.

### *Cromatografía líquida*

Se trata de la técnica cromatográfica más ampliamente utilizada, ya que es ideal para la separación de compuestos de un amplio rango de polaridades (Niessen 2006), por su versatilidad al poder variar la composición de la fase móvil utilizando el modo gradiente, es decir, cambiando el contenido de disolvente orgánico a lo largo de la separación cromatográfica con el objetivo de modificar la afinidad de los analitos entre ambas fases a través de la separación. Además del tipo de fases a utilizar, hay que destacar que el tamaño de partícula de la fase estacionaria es decisivo para obtener una cromatografía eficiente. Tradicionalmente, el tamaño de partícula para columnas de HPLC ha sido de 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, pero los avances en cromatografía líquida han hecho que sea posible mejorar la resolución y obtener mayor selectividad disminuyendo el tamaño de partícula a niveles de sub- $2\mu\text{m}$ , lo que se denomina cromatografía de ultra-alta resolución (*ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC). Esto ha permitido además una disminución de los tiempos de análisis y por tanto, un mayor desarrollo de métodos multianalito/multiresiduo pertenecientes a diferentes familias de contaminantes (Ardrey 2003). De hecho, en el campo de análisis tanto medioambiental, alimentario como dentro del campo del biomonitoring, se han encontrado estudios para el análisis multianalito de BFRs con un amplio abanico de polaridades (Zacs & Bartkevics 2015), e incluso para el análisis de diferentes familias de contaminantes emergentes como PFAS y algunos BFRs (Svihlikova et al. 2015).

Dentro de los contaminantes emergentes estudiados en la presente **Tesis Doctoral**, las PFAS iónicas son las sustancias cuya determinación en cualquier tipo de matriz ha sido prácticamente exclusiva de la cromatografía líquida (Dreyer et al. 2015; Babut et al. 2017; Cariou et al. 2015), sin embargo, en la determinación de retardantes de llama el uso de la cromatografía líquida depende del tipo de sustancia o sustancias a determinar. En el caso de los PBDEs, debido a su muy baja polaridad, únicamente se ha encontrado un estudio en el que se ha demostrado la aplicabilidad de la LC para este tipo de sustancias, gracias al uso de la fotoionización a presión atmosférica (APPI) como fuente de ionización, sin embargo, esto requiere un sacrificio en cuanto a sensibilidad para el resto de sustancias con una mayor polaridad (Zacs & Bartkevics 2015). Por el contrario, las aplicaciones encontradas para la determinación de compuestos organofosforados o retardantes de llama fosforados, son tanto por LC (Chu & Letcher 2015) como por GC (Deng et al. 2018). Por tanto, la selección del tipo fuente de ionización va a ser determinante para el análisis.

- *Fuentes de ionización*

Las fuentes o interfases de ionización son cruciales en el acoplamiento LC-MS ya que los compuestos acceden a la fuente en fase líquida, complicando su ionización. Las fuentes de ionización actualmente más utilizadas son: ionización por electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI) y fotoionización a presión atmosférica (APPI). Todas ellas se caracterizan por presentar una ionización débil, en la que se favorece la formación de las moléculas protonadas y muy poca o nula fragmentación (Ardrey 2003). La interfase ESI es la que presenta una mayor eficiencia para un amplio rango de compuestos. De hecho, es la más utilizada en el campo del análisis alimentario, medioambiental y de biomonitoring para la determinación de compuestos emergentes con cierta polaridad (Dreyer et al. 2015; Zhu et al. 2018; Svihlikova et al. 2015; McGoldrick et al. 2014). Ejemplo de ello, es el uso de esta interfase en la determinación sólo de algunos BFRs más polares, como pueden ser los hexabromociclododecanos (HBCDDs) y el tetrabromobisfenol A (TBBPA) (Shi et al. 2013). Tanto la interfase APCI como la APPI son técnicas que presentan una ionización eficiente para compuestos relativamente más apolares que los ionizados con la interfase electrospray. Por tanto, estas interfases no se utilizan de forma



habitual en la determinación de contaminantes emergentes, ya que con una cromatografía de gases, recomendada para sustancias apolares, se obtendría una mayor respuesta de los analitos. Sin embargo, si lo que se pretende es obtener una única metodología para la determinación de un grupo de sustancias con diferencias en su polaridad, es posible llegar a un compromiso mediante el uso de estas fuentes de ionización, aun quedando comprometida la sensibilidad del método (Chu & Letcher 2015; Zacs & Bartkevics 2015).

En cromatografía líquida, debe tenerse en cuenta el efecto matriz, que aunque también puede darse en cromatografía de gases, es de menor importancia. De hecho, el efecto matriz se considera una de las mayores problemáticas dentro del acoplamiento LC-MS, afectando a la sensibilidad, precisión y exactitud del método analítico. Se da una alteración de la eficiencia de la ionización en la fuente debida a la presencia de sustancias coeluidas. Aunque no se conoce exactamente el motivo por el que se da este efecto matriz, bien por supresión o bien por exaltación, se piensa que se debe a un proceso de competición entre los analitos y los coeluyentes de la matriz. Uno de los mecanismos para evitar el posible efecto matriz, además de intentar reducir el contenido de la matriz y de compensarlo en el proceso de cuantificación, es modificar parámetros de la fuente de ionización, así como cambiar la interfase de ionización si fuera necesario (Gosetti et al. 2010).

#### - *Analizadores*

La aparición de nuevos analizadores en espectrometría de masas como el TOF o el Orbitrap ha abierto un amplio abanico de posibilidades dentro del análisis instrumental, tanto en el campo del análisis alimentario, medioambiental como de biomonitoring. Aunque el LC-MS/MS es el equipo más utilizado para sustancias con cierta polaridad (Guerra et al. 2011; Kärroman & Lindström 2013), tal y como se ha comentado previamente, los equipos de UHPLC-HRMS son cada vez más utilizados (Megson et al. 2016; Kadar et al. 2011; Chiesa et al. 2018; Zacs & Bartkevics 2015; Baduel et al. 2015).

La capacidad de adquisición en un amplio rango de masas en barrido completo, resolución alta ( $\geq 20000$  FWHM), exactitud de masa y sensibilidad son las principales ventajas que ofrece la HRMS frente a la

espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Los espectrómetros de masas de alta resolución más utilizados en cromatografía líquida para el análisis de contaminantes emergentes son el tiempo de vuelo (TOF), el Orbitrap, así como los acoplamientos QTOF y QOrbitrap.

- *Analizador Orbitrap*

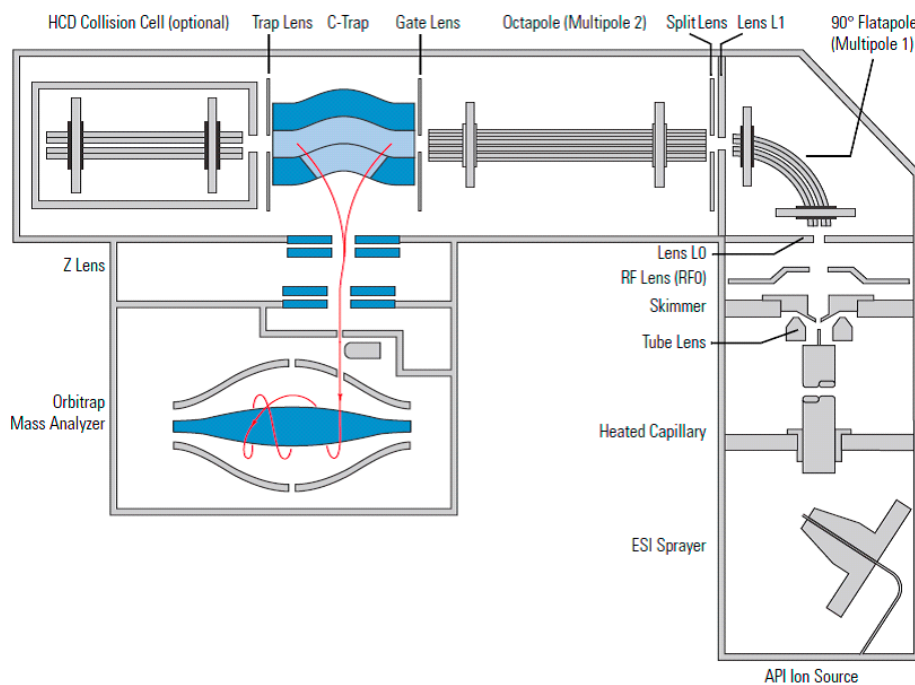
El proceso seguido en un Orbitrap-HRMS tras la separación cromatográfica es, en primer lugar, la generación de iones en la fase líquida a través de ionización mediante ESI o en la fase gaseosa mediante APCI. Una vez ionizados, una serie de lentes y multipolos (*ion optics*) canalizan los iones hacia el *C-Trap* donde quedan retenidos hasta la entrada por grupos de iones en el Orbitrap. Si se requiere fragmentación los iones entran en la celda de colisión *Higher Energy Colision Induced Dissociation* (HCD) para ser fragmentados mediante aplicación de un determinado voltaje. Los fragmentos procedentes de la celda pasan entonces al *C-Trap*. Desde el *C-Trap*, los iones se mueven mediante movimiento de traslación y rotación alrededor del eje central del analizador de manera que la frecuencia de estas oscilaciones armónicas es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la  $m/z$  del ion. De esta manera, conociendo la frecuencia de oscilación, a través de la transformada de Fourier, se puede determinar el valor de  $m/z$  (Hu et al. 2005).

El elevado poder de resolución de este tipo de analizador (>25.000 – 100.000 FWHM) junto con la elevada exactitud de masa (que proporciona elevada selectividad, 1 - 5 ppm), hace que comience a tener gran relevancia su uso en gran variedad de aplicaciones, como en el campo de la metabolómica, proteómica, etc., además de en la determinación de sustancias contaminantes en muestras alimentarias, ambientales y biológicas (Hu et al. 2005; Abdallah et al. 2015; Kadar et al. 2011; Zacs & Bartkevics 2015).

En la **Figura 10** se muestra un esquema de un equipo HR-Orbitrap-MS (Exactive), que consta básicamente de la fuente de iones, la óptica, el *C-Trap* y el analizador de masas Orbitrap.

La gran ventaja de este tipo de analizadores es la posibilidad de realizar análisis no dirigido (*non-target*), todo  $m/z$  dentro del rango de masas definido se registra durante todo el análisis, guardándose los datos del

espectro completo; y permitiendo así el análisis retrospectivo de la muestra incluso años después de la adquisición de datos.



**Figura 10.** Esquema del HR-Orbitrap-MS (Exactive).

#### 4. OPTIMIZACIÓN MULTIVARIANTE

Tanto los métodos cromatográficos y de detección como las metodologías de extracción y purificación se ven influenciados por un gran número de factores, los cuales en función de su valor pueden afectar en menor o mayor grado a los diferentes analitos motivo de estudio, influyendo en las respuestas obtenidas de los mismos, y por ende, en la robustez, exactitud y reproducibilidad del método. Es por ello que para el desarrollo de una metodología analítica se requiere de la optimización de cada una de sus etapas con el fin de maximizar la eficiencia del proceso global. Es posible realizar la optimización de estas etapas de una manera tradicional o clásica, modificando de uno en uno los factores, pudiéndose complicar dicha optimización con un mayor número de experimentos si estos factores presentan correlación entre ellos. La optimización puede llevarse a cabo también mediante el uso de la optimización multivariante o diseño de experimentos (DoE), en el cual se tiene en cuenta las posibles interacciones entre los diferentes parámetros a optimizar.

La estrategia adoptada por la serie de métodos que pueden clasificarse como diseño experimental es aquella información de variables múltiples que puede ajustarse a una función empírica, normalmente lineal o cuadrática con interacción entre los distintos términos, los cuales pueden ser útiles para proporcionar información sobre el sistema (máximos y mínimos, tendencias de cómo van variando los parámetros, etc.). Se usa la teoría estadística para seleccionar valores de cada factor y generar los datos con el fin de maximizar la información sobre los parámetros de la función. La asignación al azar del orden de experimentos garantiza, en la medida de lo posible, que cualquier variable no controlada contribuya a la desviación de la repetibilidad y no afecte a los resultados de manera sistemática (Hibbert 2012; Massart et al. 1997).

Existen diferentes tipos de diseños experimentales, los cuales pueden distinguirse por el modelo del que derivan (lineal o cuadrático, con o sin interacciones), por las limitaciones de los niveles de factor, y por el propósito del estudio (screening, optimización):

- Diseño factorial
- Diseño Plackett–Burman (PB)
- Diseño de composición central (*central composite design*, CCD)

- Diseño Box–Behnken
- Diseño Doehlert
- Diseño D-optimal

De todos estos diseños, hay que destacar los diseños factoriales, los cuales asocian experimentos a cada combinación de niveles de factor. En el diseño factorial completo se realizan todos los experimentos posibles (combinaciones de variables), mientras que en el diseño factorial fraccional se lleva a cabo solo una parte específica que permite el cálculo de ciertos coeficientes del modelo. Con estos diseños se obtienen los efectos central y de interacción de cada factor. El diseño Plackett–Burman es uno de los más populares, en el que se demuestra la falta de efectos significativos en estudios de robustez para validación de métodos. Y los CCD, los cuales deben su nombre a la combinación de un diseño factorial de dos niveles con un diseño “*star*” y con elementos de centro, con este tipo de diseño experimental se identifican los factores significativos con su posterior optimización para el desarrollo del método (Hibbert 2012).

Por tanto, en una optimización multivariante, se trata de identificar qué factores van a tener una mayor relevancia en la optimización del método, es decir, cuáles de ellos van a afectar en mayor o menor medida a la respuesta de cada analito. Para ello puede aplicarse un diseño Plackett–Burman o un diseño factorial (Hecht et al. 2016). Una vez se conocen los tres o cuatro factores más significativos, se debe realizar la optimización, recurriendo entonces al diseño experimental más ampliamente utilizado, el “*central composite design*”, del cual se pueden obtener gráficos de superficies de respuesta en función de dos factores, los cuales nos van a ayudar a interpretar si existe una respuesta máxima clara, además de obtener el valor de “deseabilidad” para cada analito de entre 0 y 1. Y el de deseabilidad global, también entre 0 y 1 (Asati et al. 2017).

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, M. A.-E., Zhang, J., Pawar, G., Viant, M.R., Chipman, J.K., D'Silva, K., Bromirski, M. & Harrad, S. (2015). *High-resolution mass spectrometry provides novel insights into products of human metabolism of organophosphate and brominated flame retardants*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (7) 1871–1883. doi:10.1007/s00216-015-8466-z.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2018). *Toxicological Profile for Perfluoroalkyls. (Draft for Public Comment)*. U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA.
- Angerer, J., Ewers, U. & Wilhelm, M. (2007). *Human biomonitoring: State of the art*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210, 201–228. doi:10.1016/j.ijheh.2007.01.024.
- Antignac, J.-P., Veyrand, B., Kadar, H., Marchand, P., Oleko, A., Le, B. & Vandentorren, S. (2013). *Chemosphere occurrence of perfluorinated alkylated substances in breast milk of French women and relation with socio-demographical and clinical parameters: Results of the ELFE pilot study*. *Chemosphere*, 91, 802–808. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.088.
- Aragón, M., Marcé, R.M. & Borrull, F. (2012). *Determination of phthalates and organophosphate esters in particulated material from harbour air samples by pressurised liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry*. *Talanta*, 101, 473–478. doi:10.1016/j.talanta.2012.09.062.
- Ardrey, R.E. (2003). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: an introduction*. John Wiley & Sons Ltd, the Atrium, Southern Gate, England.
- Asati, A., Satyanarayana, G.N.V. & Patel, D. K. (2017). *Comparison of two microextraction methods based on solidification of floating organic droplet for the determination of multiclass analytes in river water samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry using Central Composite Design*. *Journal of Chromatography A*, 1513, 157–171. doi:10.1016/j.chroma.2017.07.048.

- Babut, M., Labadie, P., Simonnet-Laprade, C., Munoz, G., Roger, M.-C., Ferrari, B.J.D., Budzinski, H. & Sivade, E. (2017). *Per- and poly-fluoroalkyl compounds in freshwater fish from the Rhône River: Influence of fish size, diet, prey contamination and biotransformation*. Science of the Total Environment, 605-606, 38–47. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.111.
- Baduel, C., Mueller, J.F., Tsai, H. & Gomez, M.J. (2015). *Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices*. Journal of Chromatography A, 1426, 33–47. doi:10.1016/j.chroma.2015.11.040.
- Barr, D.B., Wang, R.Y. & Needham, L.L. (2005). *Biologic monitoring of exposure to environmental chemicals throughout the life stages: Requirements and issues for consideration for the national children's study*. Environmental Health Perspectives, 113 (8) 1083–1091. doi:10.1289/ehp.7617.
- Bartolomé, M., Gallego-Picó, A., Cutanda, F., Huetos, O., Esteban, M., Pérez-Gómez, B. & Castaño, A. (2017). *Perfluorinated alkyl substances in Spanish adults: Geographical distribution and determinants of exposure*. Science of The Total Environment, 603–604, 352–360. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.031.
- Bergman, Å., Rydén, A., Law, R.J., de Boer, J., Covaci, A., Alaee, M., Birnbaum, L., Petreas, M., Rose, M., Sakai, S., Van den Eede, N. & van der Veen, I. (2012). *A novel abbreviation standard for organobromine, organochlorine and organophosphorus flame retardants and some characteristics of the chemicals*. Environment International, 49, 57–82. doi:10.1016/j.envint.2012.08.003.
- Bertin, D., Labadie, P., Ferrari, B.J.D., Sapin, A., Garric, J., Geffard, O., Budzinski, H. & Babut, M. (2016). *Potential exposure routes and accumulation kinetics for poly- and per fluorinated alkyl compounds for a freshwater amphipod: Gammarus spp. (Crustacea)*. Chemosphere, 155, 380–387. doi: <10.1016/j.chemosphere.2016.04.006.
- Berton, P., Lana, N.B., Ríos, J.M., García-Reyes, J.F. & Altamirano, J.C. (2016). *State of the art of environmentally friendly sample preparation approaches for determination of PBDEs and metabolites in environmental and biological samples: A critical review*. Analytica Chimica Acta, 905, 24-41. doi:10.1016/j.aca.2015.11.009.

- Bichon, E., Guiffard, I., Vénisseau, A., Lesquin, E., Vaccher, V., Brosseaud, A., Marchand, P. & Le Bizec, B. (2016). *Simultaneous determination of 16 brominated flame retardants in food and feed of animal origin by fast gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry using atmospheric pressure chemical ionisation*. *Journal of Chromatography A*, 1459, 120–128. doi:10.1016/j.chroma.2016.07.003.
- Bossi, R., Vorkamp, K. & Skov, H. (2016). *Concentrations of organochlorine pesticides, polybrominated diphenyl ethers and perfluorinated compounds in the atmosphere of North Greenland*. *Environmental Pollution*, 217, 4–10. doi:10.1016/j.envpol.2015.12.026.
- Brits, M., de Vos, J., Weiss, J.M., Rohwer, E.R. & de Boer, J. (2016). *Critical review of the analysis of brominated flame retardants and their environmental levels in Africa*. *Chemosphere*, 164, 174–189. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.08.097.
- Buck, R.C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J.M., Cousins, I.T., de Voogt, P., Jensen, A.A., Kannan, K., Mabury, S.A. & van Leeuwen, S.P.J. (2011). *Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: Terminology, classification, and origins*. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7 (4) 513–541. doi:10.1002/ieam.258.
- Cariou, R., Veyrand, B., Yamada, A., Berrebi, A., Zalko, D., Durand, S., Pollono, C., Marchand, P., Leblanc, J.-C., Antignac, J.-P. & Le Bizec, B. (2015). *Perfluoroalkyl acid (PFAA) levels and profiles in breast milk, maternal and cord serum of French women and their newborns*. *Environment International*, 84, 71–81. doi:10.1016/j.envint.2015.07.014.
- Čechová, E., Seifertová, M., Kukučka, P., Vojta, S., Quaak, I., De Cock, M., Van De Bor, M. & Kočan, A. (2017). *An effective clean-up technique for GC/EI-HRMS determination of developmental neurotoxicants in human breast milk*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409, 1311–1322. doi:10.1007/s00216-016-0059-y.
- Čechová, E., Vojta, S., Kukučka, P., Kočan, A., Trnovec, T., Murínová, L.P., De Cock, M., van de Bor, M., Askevold, J., Eggesbø, M. & Scheringer, M. (2017). *Legacy and alternative halogenated flame retardants in human milk in Europe: Implications for children's health*. *Environment international*, 108, 137–145. doi:10.1016/j.envint.2017.08.008.



- Chen, Z.-J., Liu, H.-Y., Cheng, Z., Man, Y.-B., Zhang, K.-S., Wei, W., Du, J., Wong, M.-H. & Wang, H.-S. (2014). *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in human samples of mother–newborn pairs in South China and their placental transfer characteristics*. *Environmental International*, 73, 77–84. doi:10.1016/j.envint.2014.07.002.
- Chiesa, L.M., Nobile, M., Pasquale, E., Balzaretto, C., Cagnardi, P., Tedesco, D., Panseri, S. & Arioli, F. (2018). *Detection of perfluoroalkyl acids and sulphonates in Italian eel samples by HPLC-HRMS Orbitrap*. *Chemosphere*, 193, 358–364. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.10.082.
- Chu, S. & Letcher, R.J. (2015). *Determination of organophosphate flame retardants and plasticizers in lipid-rich matrices using dispersive solid-phase extraction as a sample cleanup step and ultra-high performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass*. *Analytica Chimica Acta*, 885, 183–190. doi:10.1016/j.aca.2015.05.024.
- Ciccotelli, V., Abete, M.C. & Squadrone, S. (2016). *PFOS and PFOA in cereals and fish: Development and validation of a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method*. *Food Control*, 59, 46–52. doi:10.1016/j.foodcont.2015.05.023.
- Comisión de las Comunidades Europeas, 2004. *Comunicación de la Comisión al Consejo, al Parlamento Europeo y al Comité Económico y Social Europeo: Plan de Acción Europeo de Medio Ambiente y Salud (2004-2010)*. Volume I COM(2004)416, Brussels.
- Couture, C., Fortin, M.-C., Carrier, G., Dumas, P., Tremblay, C. & Bouchard, M. (2009). *Assessment of exposure to pyrethroids and pyrethrins in a rural population of the Montérégie area, Quebec, Canada*. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 6, 341–352. doi:10.1080/15459620902850907.
- Cui, C., Tian, Y., Zhang, L., Gao, Y., Jin, J., Wang, P., Ding, W., Wang, X., Shi, R. & Wang, Y. (2012). *Polybrominated diphenyl ethers exposure in breast milk in Shanghai, China: Levels, influencing factors and potential health risk for infants*. *Science of the Total Environment*, 433, 331–335. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.06.075.

- de Wit, C.A. (2002). *An overview of brominated flame retardants in the environment*. *Chemosphere*, 46, 583–624.
- Deng, W.-J., Li, N., Wu, R., Richard, W.K.S., Wang, Z. & Ho, W. (2018). *Phosphorus flame retardants and Bisphenol A in indoor dust and PM<sub>2.5</sub> in kindergartens and primary schools in Hong Kong*. *Environmental Pollution*, 235, 365-371. doi:10.1016/j.envpol.2017.12.093.
- Desforges, J.-P., Eulaers, I., Periard, L., Sonne, C., Dietz, R. & Letcher, R.J. (2017). *A rapid analytical method to quantify complex organohalogen contaminant mixtures in large samples of high lipid mammalian tissues*. *Chemosphere*, 176, 243–248. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.02.098.
- Devanathan, G., Subramanian, A., Sudaryanto, A., Takahashi, S., Isobe, T. & Tanabe, S. (2012). *Brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in human breast milk from several locations in India: Potential contaminant sources in a municipal dumping site*. *Environment International*, 39, 87-95. doi:10.1016/j.envint.2011.10.005.
- Ding, N., Wang, T., Chen, S.J., Yu, M., Zhu, Z.C., Tian, M., Luo, X.J. & Mai, B.X. (2016). *Brominated flame retardants (BFRs) in indoor and outdoor air in a community in Guangzhou, a megacity of Southern China*. *Environmental Pollution*, 212, 457–63. doi:10.1016/j.envpol.2016.02.038.
- Directiva (UE) 2015/1480 de la Comisión de 28 de Agosto de 2015, por la que se modifican varios anexos de las directivas 2004/107/CE y 2008/50/CE del Parlamento y del Consejo Europeo en los que se establecen las normas relativas a los métodos de referencia, la validación de datos y la ubicación de los puntos de muestreo para la evaluación de la calidad del aire ambiente. *Diario Oficial de la Union Europea* L226 (2015) pp 4-11.
- Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council (2003) on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment. *Official Journal of the European Union*, L37 (2003) pp 19–23.
- Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe. *Official Journal of the European Union*, L152 (2008) pp 1-44.

- Donaldson, S.G., Van Oostdam, J., Tikhonov, C., Feeley, M., Armstrong, B., Ayotte, P., Boucher, O., Bowers, W., Chan, L., Dallaire, F., Dallaire, R., Dewailly, É., Edwards, J., Egeland, G.M., Fontaine, J., Furgal, C., Leech, T., Loring, E., Muckle, G., Nancarrow, T., Pereg, D., Plusquellec, P., Potyrala, M., Receveur, O. & Shearer, R.G. (2010). *Environmental contaminants and human health in the Canadian Arctic*. Science of The Total Environment, 408, 5165–5234. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.04.059.
- Dorne, J.L.C.M. & Fink-Gremmels, J. (2013). *Human and animal health risk assessments of chemicals in the food chain: Comparative aspects and future perspectives*. Toxicology and Applied Pharmacology, 270, 187–195. doi:10.1016/j.taap.2012.03.013.
- Dreyer, A., Kirchgeorg, T., Weinberg, I. & Matthias, V. (2015). *Particle-size distribution of airborne poly- and perfluorinated alkyl substances*. Chemosphere, 129, 142–149. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.06.069.
- EFSA, FAO, and WHO (2011). *Towards a harmonised Total Diet Study approach: a guidance document*. EFSA Journal, 9 (11) 2450. doi:10.2903/j.efsa.2011.2450.
- Esteban, M. & Castaño A. (2009). *Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review*. Environment International, 35, 438–449.
- European Chemicals Agency (ECHA) (2017). *Candidate list of substances of very high concern for authorisation*. <https://echa.europa.eu/candidate-list-table>. Data accessed 10/18/2018.
- European Chemicals Agency (ECHA) & European Food Safety Authority (EFSA) (2018). *Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009*. EFSA Journal, 16 (6) 5311. doi:10.2903/j.efsa.2018.5311.
- European Commission, 2010. *Commission staff working document: Progress Report on the Implementation of the "European Environment and Health Action Plan 2004 -2010"*. SEC(2010)387, Brussels.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2008). *Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts: Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain*. (Question No EFSA-Q-2004-163) PANEL MEMBERS. The EFSA Journal, 653, 1–131.

- European Food Safety Authority (EFSA) (2011). *Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food*. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). The EFSA Journal, 9 (5) 2156. doi:10.2903/j.efsa.2011.2156.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012)a. *Scientific Opinion on Emerging and Novel Brominated Flame Retardants (BFRs) in Food*. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). The EFSA Journal, 10 (10) 125. doi:10.2903/j.efsa.2012.2908.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012)b. *Perfluoroalkylated Substances in Food: Occurrence and Dietary Exposure*. Scientific Report. The EFSA Journal, 10 (6) 2743. doi:10.2903/j.efsa.2012.2743.
- Fernández-Cruz, T., Martínez-Carballo, E. & Simal-Gándara, J. (2017). *Perspective on pre- and post-natal agro-food exposure to persistent organic pollutants and their effects on quality of life*. Environment International, 10, 79-101. doi:10.1016/j.envint.2017.01.001.
- Fernández-Navarro, P., García-Pérez, J., Ramis, R., Boldo, E. & López-Abente, G. (2017). *Industrial pollution and cancer in Spain: An important public health issue*. Environmental Research, 159, 555-563. doi:10.1016/j.envres.2017.08.049.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) & World Health Organization (WHO) (2006). *Food Safety Risk Analysis. A Guide for National Food Safety Authorities*. FAO Food and Nutrition Paper 87. <http://www.fao.org/docrep/012/a0822e/a0822e.pdf>.
- Forns, J., Iszatt, N., White, R.A.A., Mandal, S., Sabaredzovic, A., Lamoree, M., Thomsen, C., Haug, L.S.S., Stigum, H. & Eggesbø, M. (2015). *Perfluoroalkyl substances measured in breast milk and child neuropsychological development in a Norwegian birth cohort study*. Environment International, 83, 176–82. doi:10.1016/j.envint.2015.06.013.
- Fromme, H., Becher, G., Hilger, B. & Völkel, W. (2016). *Brominated flame retardants - Exposure and risk assessment for the general population*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 219, 1–23. doi:10.1016/j.ijheh.2015.08.004.

- Fromme, H., Bolte, G., Koch, H.M., Angerer, J., Boehmer, S., Drexler, H., Mayer, R. & Liebl, B. (2007). *Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 210 (1) 21-33.
- Fromme, H., Tittlemier, S.A., Völkel, W., Wilhelm, M. & Twardella, D. (2009). *Perfluorinated compounds - Exposure assessment for the general population in western countries*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 212, 239-270. doi:10.1016/j.ijheh.2008.04.007.
- Gao, Z., Deng, Y., Yuan, W, He, H., Yang, S. & Sun, C. (2014). *Determination of Organophosphorus flame retardants in fish by pressurized liquid extraction using aqueous solutions and solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame photometric detector*. Journal of Chromatography A, 1366, 31-37. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.028.
- Gavrilescu, M., Demnerová, K., Aamand, J., Agathos, S. & Fava, F. (2015). *Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation*. New Biotechnology, 32, 147-156. doi:10.1016/j.nbt.2014.01.001.
- Geng, D., Kukucka, P. & Jogsten, I.E. (2017). *Analysis of brominated flame retardants and their derivatives by atmospheric pressure chemical ionization using gas chromatography coupled to tandem quadrupole mass spectrometry*. Talanta, 162, 618-624. doi:10.1016/j.talanta.2016.10.060.
- Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D. & Gennaro, M.C. (2010). *Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1217, 3929-3937. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.060.
- Guerra, P., Eljarrat, E. & Barceló, D. (2011). *Determination of halogenated flame retardants by liquid chromatography coupled to mass spectrometry*. Trends in Analytical Chemistry, 30 (6) 842-855. doi:10.1016/j.trac.2011.01.018.
- Guo, M., Lyu, Y., Xu, T., Yao, B., Song, W., Li, M., Yang, X., Cheng, T. & Li, X. (2018). *Particle size distribution and respiratory deposition estimates of airborne perfluoroalkyl acids during the haze period in the megacity of Shanghai*. Environmental Pollution, 234, 9-19. doi:10.1016/j.envpol.2017.10.128.

- Guo, W., Holden, A., Smith, A.C., Gephart, R., Petreas, M. & Park, J.-S. (2016). *PBDE levels in breast milk are decreasing in California*. *Chemosphere*, 150, 505–513. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.11.032.
- Hassine, S.B., Ameer, W.B., Gandoura, N. & Driss, M.R. (2012). *Determination of chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in human milk from Bizerte (Tunisia) in 2010*. *Chemosphere*, 89, 369–377. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.05.035.
- HBM4EU - German Environmental Agency (2017). *Human Biomonitoring for Europe*. <https://www.hbm4eu.eu/the-project/>. Data accessed 10/18/2018.
- He, C., Wang, X., Thai, P., Baduel, C., Gallen, C., Banks, A., Bainton, P., English, K. & Mueller, J.F. (2018). *Organophosphate and brominated flame retardants in Australian indoor environments: Levels, sources, and preliminary assessment of human exposure*. *Environmental Pollution*, 235, 670–679. doi:10.1016/j.envpol.2017.12.017.
- Hecht, E.S., Oberg, A.L. & Muddiman, D.C. (2016). *Optimizing mass spectrometry analyses: A tailored review on the utility of design of experiments*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 27, 767–785. doi:10.1007/s13361-016-1344-x.
- Hendriks, H.S. & Westerink, R.H.S. (2015). *Neurotoxicity and risk assessment of brominated and alternative flame retardants*. *Neurotoxicology and Teratology*, 52, 248–269. doi:10.1016/j.ntt.2015.09.002.
- Hernández, F., Sancho, J.V., Ibáñez, M., Abad, E., Portolés, T. & Mattioli, L. (2012). *Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403, 1251–1264. doi:10.1007/s00216-012-5844-7.
- Hibbert, D.B. (2012). *Experimental design in chromatography: A tutorial review*. *Journal of Chromatography B*, 910, 2–13. doi:10.1016/j.jchromb.2012.01.020.
- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M. & Cooks, R.G. (2005). *The orbitrap: A new mass spectrometer*. *Journal of Mass Spectrometry*, 40, 430–443. doi:10.1002/jms.856.

- Ize, I., Zuk, M., & Rojas-Bracho, L. (2010). *Introducción al análisis de riesgos ambientales*. Instituto Nacional de Ecología. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.
- Janssen, H.-G., Marriott, P. & Vreuls, R. (2008). *Trends and developments in gas chromatography*. Journal of Chromatography A, 1186 (1-2) 1-440. doi:10.1016/j.chroma.2008.01.041.
- Kadar, H., Veyrand, B., Barbarossa, A., Pagliuca, G., Legrand, A., Boshier, C., Boquien, C.-Y., Durand, S., Monteau, F., Antignac, J.-P. & Le Bizec, B. (2011). *Development of an analytical strategy based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for measuring perfluorinated compounds in human breast milk: Application to the generation of preliminary data regarding perinatal exposure in France*. Chemosphere, 85 (3) 473–480. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.077.
- Kang, H., Choi, K., Lee, H.-S., Kim, D.-H., Park, N.-Y, Kim, S. & Kho, Y. (2016). *Elevated levels of short carbon-chain PFCA in breast milk among Korean women: Current status and potential challenges*. Environmental Research, 148, 351–359. doi:10.1016/j.envres.2016.04.017.
- Kärman, A. & Lindström, G. (2013). *Trends, analytical methods and precision in the determination of perfluoroalkyl acids in human milk*. Trends in Analytical Chemistry, 46, 118–128. doi:10.1016/j.trac.2012.10.009.
- Kim, J.W., Isobe, T., Chang, K.H., Amano, A., Maneja, R.H., Zamora, P.B., Siringan, F.P. & Tanabe, S. (2011). *Levels and distribution of organophosphorus flame retardants and plasticizers in fishes from Manila Bay, the Philippines*. Environmental Pollution, 159, 3653–3659. doi:10.1016/j.envpol.2011.07.020.
- Krafft, M. P. & Riess, J.G. (2015). *Per- and polyfluorinated substances (PFASs): Environmental challenges*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 20, 192–212. doi:10.1016/j.cocis.2015.07.004.
- Kurt-Karakus, P., Alegria, H., Birgul, A., Gungormus, E. & Jantunen, L. (2017). *Organophosphate ester (OPEs) flame retardants and plasticizers in air and soil from a highly industrialized city in Turkey*. Science of the Total Environment, 625, 555–65. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.12.307.

- Lankova, D., Lacina, O., Pulkrabova, J. & Hajslova, J. (2013). *The determination of perfluoroalkyl substances, brominated flame retardants and their metabolites in human breast milk and infant formula*. *Talanta*, 117, 318–325. doi:10.1016/j.talanta.2013.08.040.
- Law, R.J., Covaci, A., Harrad, S., Herzke, D., Abdallah, M.A.-E., Fernie, K., Toms, L.M.L. & Takigami, H. (2014). *Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: Status at the end of 2012*. *Environment International*, 65, 147–158. doi:10.1016/j.envint.2014.01.006.
- Lechuga, P. & Paredes, M.L. (2014). *Efectos biológicos derivados de la exposición a PBDEs en trabajadores del reciclaje de e-waste: revisión sistemática*. *Medicina y Seguridad en el Trabajo (Internet)*, 60 (237) 685–713.
- Lee, S., Kim, S., Kim, E., Lee, I.-S., Choi, G., Kim, H.-J, Park, J., Lee, J.J, Choi, S., Kim, S.Y., Kim, S., Kim, S., Choi, K. & Moon, H.-B. (2013). *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in breast milk of Korea in 2011: Current contamination, time course variation, influencing factors and health risks*. *Environmental Research*, 126, 76-83. doi:10.1016/j.envres.2013.08.004.
- Lehotay, S.J., Sapozhnikova, Y. & Mol, H.G.J. (2015). *Current issues involving screening and identification of chemical contaminants in foods by mass spectrometry*. *Trends in Analytical Chemistry*, 69, 62–75. doi:10.1016/j.trac.2015.02.012.
- Li, Y., Chen, L., Wen, Z.-H., Duan, Y.-P., Lu, Z.-B., Meng, X.-Z. & Zhang, W. (2015). *Characterizing distribution, sources, and potential health risk of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in office environment*. *Environmental Pollution*, 198, 25-31. doi:10.1016/j.envpol.2014.12.024.
- Liagkouridis, I., Cousins, A.P. & Cousins, I.T. (2015). *Physical-chemical properties and evaluative fate modelling of “emerging” and “novel” brominated and organophosphorus flameretardants in the indoor and outdoor environment*. *Science of the Total Environment*, 524–525, 416–426. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.02.106.



- Liu, Y.-E, Huang. L.-Q., Luo, X.-J., Tan, X.-X., Huang, C.-C., Zapata, P. & Mai, B.-X. (2018). *Determination of organophosphorus flame retardants in fish by freezing-lipid precipitation, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1532, 68–73. doi:10.1016/j.chroma.2017.12.001.
- Lorenzo, M., Farré, M., Blasco, C., Onghena, M., Picó, Y. & Barceló, D. (2016). *Perfluoroalkyl substances in Breast milk, infant formula and baby food from Valencian Community (Spain)*. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 6, 108–115. doi:10.1016/j.enmm.2016.09.001.
- Ma, W.L., Li, W.L., Zhang, Z.F., Liu, L.Y., Song, W.W., Huo, C.Y., Yuan, Y.X. & Li, Y.F. (2017). *Occurrence and source apportionment of atmospheric halogenated flame retardants in Lhasa City in the Tibetan Plateau, China*. *Science of the Total Environment*, 607–608, 1109–1116. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.07.112.
- Ma, Y., Cui, K., Zeng, F., Wen, J., Liu, H., Zhu, F., Ouyang, G., Luan, T. & Zeng, Z. (2013). *Microwave-assisted extraction combined with gel permeation chromatography and silica gel cleanup followed by gas chromatography-mass spectrometry for the determination of organophosphorus flame retardants and plasticizers in biological samples*. *Analytica Chimica Acta*, 786, 47–53. doi:10.1016/j.aca.2013.04.062.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. Amsterdam.
- Mazzoni, M., Polesello, S., Rusconi, M. & Valsecchi, S. (2016). *Liquid chromatography mass spectrometry determination of perfluoroalkyl acids in environmental solid extracts after phospholipid removal and on-line turbulent flow chromatography purification*. *Journal of Chromatography A*, 1453, 62–70. doi:10.1016/j.chroma.2016.05.047.
- McGoldrick, D.J., Letcher, R.J., Barresi, E., Keir, M.J., Small, J., Clark, M.J., Sverko, E. & Backus, S.M. (2014). *Organophosphate flame retardants and organosiloxanes in predatory freshwater fish from locations across Canada*. *Environmental Pollution*, 193, 254–261. doi:10.1016/j.envpol.2014.06.024.

- Megson, D., Reiner, E.J., Jobst, K.J., Dorma, F.L., Robson, M. & Focant, J.-F. (2016). *A review of the determination of persistent organic pollutants for environmental forensics investigations*. *Analytica Chimica Acta*, 941, 10-25. doi:10.1016/j.aca.2016.08.027.
- Möller, A., Sturm, R., Xie, Z., Cai, M., He, J. & Ebinghaus, R. (2012). *Organophosphorus flame retardants and plasticizers in airborne particles over the Northern Pacific and Indian Ocean toward the polar regions: Evidence for global occurrence*. *Environmental Science and Technology*, 46, 3127–3134. doi:10.1021/es204272v.
- Möller, A., Xie, Z., Caba, A., Sturm, R. & Ebinghaus, R. (2011). *Organophosphorus flame retardants and plasticizers in the atmosphere of the North Sea*. *Environmental Pollution*, 159, 3660–3665. doi:10.1016/j.envpol.2011.07.022.
- Motas, M., Clementini, C., Pérez-cárceles, M.D., Jiménez, S., Cascone, A., Martellini, T., Guerranti, C. & Cincinelli, A. (2016). *Science of the total environment perfluorinated carboxylic acids in human breast milk from Spain and estimation of infant's daily intake*. *Science of the Total Environment*, 544, 595–600. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.059.
- Müller, C.E., Gerecke, A.C., Bogdal, C., Wang, Z. & Scheringer, M. (2012). *Atmospheric fate of poly- and perfluorinated alkyl substances (PFASs): I. Day-night patterns of air concentrations in summer in Zurich, Switzerland*. *Environmental Pollution*, 169, 196–203. doi:10.1016/j.envpol.2012.03.037.
- Needham, L.L., Calafat, A.M. & Barr, D.B. (2007). *Uses and issues of biomonitoring*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210, 229–238. doi:10.1016/j.ijheh.2006.11.002.
- Newton, S., Sellström, U. & de Wit, C.A. (2015). *Emerging flame retardants, PBDEs and HBCDDs in indoor and outdoor media in Stockholm, Sweden*. *Environmental Science & Technology*, 49, 2912–2920. doi:10.1021/es505946e.
- Niessen, W.M.A. (2006). *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. *Chromatographic Science Series*, Vol. 97, pp 62. Taylor & Francis Group.

- Novak, P., Zuliani, T., Milačič, R. & Sčančar, J. (2017). *Development of an analytical method for the determination of polybrominated diphenyl ethers in mussels and fish by gas chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1524, 179–187. doi:10.1016/j.chroma.2017.09.059.
- Okáľová, Z. (2014). *Determination of perfluorinated organic acids in soil by gas chromatography*. Faculty of Science. Charles University in Prague.
- Papachlimitzou, A., Barber, J.L., Losada, S., Bersuder, P. & Law, R.J. (2012). *A review of the analysis of novel brominated flame retardants*. Journal of Chromatography A, 1219, 15–28. doi:10.1016/j.chroma.2011.11.029.
- Parry, E., Zota, A.R., Park, J.S. & Woodruff, T.J. (2018). *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and hydroxylated PBDE metabolites (OH-PBDEs): A six-year temporal trend in Northern California pregnant women*. Chemosphere, 195, 777–783. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.12.065.
- Poole, C.F. & Berezkin, V.G. (2005). *The essence of chromatography*. Journal Analytical Chemistry, 60, 193–193.
- Portolés, T., Rosales, L.E., Sancho, J.V., Santos, F.J. & Moyano, E. (2015). *Gas chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization for fluorotelomer alcohols and perfluorinated sulfonamides determination*. Journal of Chromatography A, 1413, 107–116. doi:10.1016/j.chroma.2015.08.016.
- Qi, H., Li, W.L., Liu, L.Y., Song, W.W., Ma, W.L. & Li, Y.F. (2014). *Brominated flame retardants in the urban atmosphere of Northeast China: Concentrations, temperature dependence and gas-particle partitioning*. Science of the Total Environment, 491–492, 60–66. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.03.002.
- Rand, A.A. & Mabury, S.A. (2017). *Is there a human health risk associated with indirect exposure to perfluoroalkyl carboxylates (PFCAs)?* Toxicology, 375, 28–36. doi:10.1016/j.tox.2016.11.011.
- Recomendación 2010/161/UE de la Comisión de 17 de Marzo de 2010 relativa a la vigilancia de las sustancias perfluoroalquiladas en los alimentos. Diario Oficial de La Unión Europea L68 (2010) pp 22–23.

Recomendación 2014/118/UE de la Comisión de 3 de Marzo de 2014 sobre la vigilancia de los residuos de materiales ignífugos bromados en los alimentos. Diario Oficial de La Unión Europea L65 (2014) pp 39-40.

Reemtsma, T., García-López, M., Rodríguez, I., Quintana, J.B. & Rodil, R. (2008). *Organophosphorus flame retardants and plasticizers in water and air: I. Occurrence and fate*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 27 (9) 727-737. doi:10.1016/j.trac.2008.07.002.

Reglamento (CE) No 1881/2006 de la Comisión de 19 de Diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea L364 (2006) pp 5-24.

Reglamento (CE) No 1907/2006 del Parlamento y del Consejo Europeo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH) por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) No 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) No 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea L396 (2006) pp 1-852.

Reglamento (CE) No 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo de 23 de Febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea L70 (2005) pp 1-16.

Reglamento (UE) No 37/2010 de la Comisión de 22 de Diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea L15 (2010) pp 1-72.

Reglamento (UE) No 528/2012 del Parlamento y del Consejo Europeo de 22 de Mayo de 2012 relativo a la comercialización y el uso de los biocidas. Diario Oficial de La Unión Europea L167 (2012) pp 1-123.

- Reglamento (UE) 2018/605 de la Comisión de 19 de Abril de 2018 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) No 1107/2009 al establecer criterios científicos para la determinación de las propiedades de alteración endocrina. Diario Oficial de La Unión Europea L101 (2018) pp 33-36.
- Sales, C., Poma, G., Malarvannan, G., Portolés, T., Beltrán, J. & Covaci, A. (2017). *Simultaneous determination of dechloranes, polybrominated diphenyl ethers and novel brominated flame retardants in food and serum*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 409, 4507–4515. doi:10.1007/s00216-017-0411-x.
- Santín, G., Eljarrat, E. & Barceló, D. (2016). *Simultaneous determination of 16 organophosphorus flame retardants and plasticizers in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1441, 34–43. doi:10.1016/j.chroma.2016.02.058.
- Shi, Z., Jiao, Y., Hu, Y., Sun, Z., Zhou, X., Feng, J., Li, J. & Wu, Y. (2013). *Levels of tetrabromobisphenol A, hexabromocyclododecanes and polybrominated diphenyl ethers in human milk from the general population in Beijing, China*. Science of the Total Environment, 452-453, 10-18. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.02.038.
- Shoeib, M., Ahrens, L., Jantunen, L., & Harner, T. (2014). *Concentrations in air of organobromine, organochlorine and organophosphate flame retardants in Toronto, Canada*. Atmospheric Environment, 99, 140–147. doi:10.1016/j.atmosenv.2014.09.040.
- Siddique, S., Xian, Q., Abdelouahab, N., Takser, L., Phillips, S.P., Feng, Y.-L., Wang, B. & Zhu, J. (2012). *Levels of dechlorane plus and polybrominated diphenylethers in human milk in two Canadian cities*. Environment International, 39, 50-55. doi:10.1016/j.envint.2011.09.010.
- Stahl, L.L., Snyder, B.D., Olsen, A.R., Kincaid, T.M., Wathen, J.B. & Mccarty, H.B. (2014). *Perfluorinated compounds in fish from U.S. urban rivers and the Great Lakes*. Science of the Total Environment, 499, 185-195. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.126.
- Stockholm Convention (2009) SC-4 / 14. *Listing of hexabromodiphenyl ether and heptabromodiphenyl ether*.

- Stockholm Convention (2009) SC-4 / 17. *Listing of perfluorooctane sulfonic acid, its salts and perfluorooctane sulfonyl fluoride.*
- Stockholm Convention (2009) SC-4 / 18. *Listing of tetrabromodiphenyl ether and pentabromodiphenyl ether.*
- Surma, M. & Zieliński, H. (2015). *What do we know about the risk arising from perfluorinated compounds.* Polish Journal of Environmental Studies, 24 (2) 449–457. doi:10.15244/pjoes/30929.
- Svihlikova, V., Lankova, D., Poustka, J., Tomaniova, M., Hajslova, J. & Pulkrabova, J. (2015). *Perfluoroalkyl substances (PFASs) and other halogenated compounds in fish from the upper Labe River basin.* Chemosphere, 129, 170-178. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.09.096.
- Tao, F., Abdallah, M.A.-E., Ashworth, D.C., Douglas, P., Toledano, M.B. & Harrad, S. (2017). *Emerging and legacy flame retardants in UK human milk and food suggest slow response to restrictions on use of PBDEs and HBCDD.* Environment International, 105, 95-104. doi:10.1016/j.envint.2017.05.010.
- Tao, F., Abdallah, M.A.-E. & Harrad, S. (2016). *Emerging and legacy flame retardants in UK indoor air and dust: Evidence for replacement of PBDEs by emerging flame retardants?* Environmental Science & Technology, 50, 13052–13061. doi:10.1021/acs.est.6b02816.
- The Lancet Comissions (2018). *The Lancet Commission on Pollution and Health.* The Lancet, 391 (10119) 462–512. doi:10.1016/S0140-6736(17)32345-0.
- The National Academies of Science, Engineering and Medicine (2000). *Toxicological Risks of Selected Flame-Retardant Chemicals.* Washington, DC. ISBN: 0-309-07047-3.
- Thermo Fisher Scientific (2012). *DFS. Double Focusing Sector Mass Spectrometer.* Hardware Manual. Revision F.
- Trabalón, L., Vilavert, L., Domingo, J.L., Pocurull, E., Borrull, F. & Nadal, M. (2017). *Human exposure to brominated flame retardants through the consumption of fish and shellfish in Tarragona County (Catalonia, Spain).* Food and Chemical Toxicology, 104, 48–56. doi:10.1016/j.fct.2016.11.022.

- Van Bavel, B., Geng, D., Cherta, L., Mestre, J.N., Portoles, T., Abalos, M.A., Sauló, J., Abad, E., Dunstan, J., & Jones, R. (2015). *Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry (APGC/MS/MS) an alternative to high resolution mass spectrometry*. *Analytical Chemistry*, 87 (17) 9047–9053.
- Van der Oost, R., Beyer, J. & Vermeulen, N.P.E. (2003). *Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13, 57–149.
- van der Veen, I. & de Boer, J. (2012). *Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis*. *Chemosphere*, 88, 1119–1153. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.03.067.
- Vargas, F. (2005). *La contaminación ambiental como factor determinante de la salud*. *Revista Española de Salud Pública*, 79 (2), 117–127.
- Vrijheid, M., Casas, M., Gascon, M., Valvi, D. & Nieuwenhuijsen, M. (2016). *Environmental pollutants and child health—A review of recent concerns*. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219, 331–342. doi:10.1016/j.ijheh.2016.05.001.
- Wei, G.-L., Li, D.-Q., Zhuo, M.-N., Liao, Y.-S., Xie, Z.-Y., Guo, T.-L., Li, J.-J., Zhang, S.-Y. & Liang, Z.-Q. (2015). *Organophosphorus flame retardants and plasticizers: Sources, occurrence, toxicity and human exposure*. *Environmental Pollution*, 196, 29–46. doi:10.1016/j.envpol.2014.09.012.
- Widelka, M., Lydy, M.J., Wu, Y. & Chen, D. (2016). *Statewide surveillance of halogenated flame retardants in fish in Illinois, USA*. *Environmental Pollution*, 214, 627–634. doi:10.1016/j.envpol.2016.04.063.
- Winkens, K., Vestergren, R., Berger, U. & Cousins, I.T. (2017). *Early life exposure to per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs): A critical review*. *Emerging Contaminants*, 3, 55–68. doi:10.1016/j.emcon.2017.05.001.
- Wong, F., Shoeib, M., Katsoyiannis, A., Eckhardt, S., Stohl, A., Bohlin-Nizzetto, P., Li, H., Fellin, P., Su, Y. & Hung, H. (2018). *Assessing temporal trends and source regions of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in air under the Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP)*. *Atmospheric Environment*, 172, 65–73. doi:10.1016/j.atmosenv.2017.10.028.

- World Health Organization (WHO) and United Nations Environment Programme (UNEP) (2013). *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012. Summary for Decision-Makers*.
- Xu, F., García-Berdejo, A., Malarvannan, G., Gómara, B., Neels, H. & Covaci, A. (2015). *Multi-contaminant analysis of organophosphate and halogenated flame retardants in food matrices using ultrasonication and vacuum assisted extraction, multi-stage cleanup and gas chromatography–mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1401, 33–41. doi: 10.1016/j.chroma.2015.05.001.
- Yamada, A., Bemrah, N., Veyrand, B., Pollono, C., Merlo, M., Desvignes, V., Sirot, V., Marchand, P., Berrebi, A., Cariou, R., Antignac, J.-P., Le Bizec, B. & Leblanc, J.C. (2014). *Dietary exposure to perfluoroalkyl acids of specific French adult sub-populations: High seafood consumers, high freshwater fish consumers and pregnant women*. *Science of the Total Environment*, 491–492, 170–175. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.089.
- Yao, Y., Chang, S., Zhao, Y., Tang, J., Sun, H. & Xie, Z. (2017). *Per- and poly-Fluoroalkyl Substances (PFASs) in the Urban, Industrial, and Background atmosphere of Northeastern China coast around the Bohai Sea: Occurrence, partitioning, and seasonal variation*. *Atmospheric Environment*, 167, 150–158. doi:10.1016/j.atmosenv.2017.08.023.
- Yu, Z., Liao, R., Li, H., Mo, L., Zeng, X., Sheng, G. & Fu, J. (2011). *Particle-bound Dieldrin Plus and polybrominated diphenyl ethers in ambient air around Shanghai, China*. *Environmental Pollution*, 159, 2982–2988. doi:10.1016/j.envpol.2011.04.024.
- Yusà, V., Millet, M., Coscolla, C. & Roca, M. (2015). *Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. A review*. *Analytica Chimica Acta*, 891, 15–31. doi:10.1016/j.aca.2015.05.032.
- Zabaleta, I., Bizkarguenaga, E., Prieto, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Fernández, L.A. & Zuloaga, O. (2015). *Simultaneous determination of perfluorinated compounds and their potential precursors in mussel tissue and fish muscle tissue and liver samples by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1387, 13–23. doi: 10.1016/j.chroma.2015.01.089.



- Zacs, D. & Bartkevics, V. (2015). *Analytical capabilities of high performance liquid chromatography - atmospheric pressure photoionization - orbitrap mass spectrometry (HPLC-APPI-Orbitrap-MS) for the trace determination of novel and emerging flame retardants in fish*. *Analytica Chimica Acta*, 898, 60–72. doi:10.1016/j.aca.2015.10.008.
- Zhang, L., Yin, S., Zhao, Y., Shi, Z., Li, J. & Wu, Y. (2017). *Polybrominated diphenyl ethers and indicator polychlorinated biphenyls in human milk from China under the Stockholm Convention*. *Chemosphere*, 189, 32–38. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.09.014.
- Zhu, Y.-S., Yang, W.-D., Li, X.-W., Ni, H.-G. & Zeng, H. (2018). *Airborne particle-bound brominated flame retardants: Levels, size, distribution and indoor-outdoor exchange*. *Environmental Pollution*, 233, 1104-1112. doi:10.1016/j.envpol.2017.10.013.



**CAPÍTULO 2**  
**DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES**  
**EMERGENTES EN LA FASE**  
**PARTICULADA DEL AIRE**  
**MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**  
**ACOPLADAS A**  
**ESPECTOMETRÍA DE MASAS**  
**EN TÁNDEM**





## **CAPÍTULO 2. DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN LA FASE PARTICULADA DEL AIRE MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM.**

---

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	91
2. <u>ARTÍCULO CIENTÍFICO 1</u>	95
<i>Determination of Per- and Polyfluorinated substances in airborne particulate matter by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>	
3. <u>ARTÍCULO CIENTÍFICO 2</u>	131
<i>Design of experiment approach for the optimization of polybrominated diphenyl ethers determination in fine airborne particulate matter by microwave-assisted extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry</i>	
4. <u>DISCUSIÓN</u>	158
5. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	172

---



## 1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales vías de exposición a los contaminantes emergentes es sin duda la inhalación del aire ambiente, de su fase gaseosa y de su fase o materia particulada (PM). En especial, de la fase particulada fina (PM<sub>2.5</sub>), la cual se considera la más dañina ya que estas partículas presentan un diámetro igual o inferior a 2.5 micrones, pudiendo atravesar la barrera pulmonar y entrar en el sistema sanguíneo (European Commission SEC(2010)387 2010; Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council 2008; WHO 2018). Por ello, se debe tener en cuenta la presencia de ciertas sustancias no deseadas en el aire ambiente, como pueden ser algunos contaminantes emergentes, entre los que se encuentran las PFAS y los PBDEs. Estos contaminantes pueden ser liberados al medio ambiente por fuentes de emisión directa, como puede ser durante el ciclo de vida de los productos que los contienen (fabricación, uso o eliminación), o mediante fuentes de emisión indirecta, a través de productos de transformación. Es el caso, por ejemplo, de algunas PFAS neutras, las cuales se consideran precursores de las iónicas, como PFOA o PFOS; o el caso del deca-BDE (BDE-209), que se degrada térmicamente en otros PBDEs con menor grado de bromación, como penta- u octa-BDEs (Buck et al. 2011; EPA 2010). La dispersión o distribución tanto de PFAS como de PBDEs en el medio ambiente está determinada por sus propiedades físico-químicas, tales como la presión de vapor y la solubilidad en agua. Los principales medios de transporte de estas sustancias son el agua y el aire, dando lugar a trasportes de larga distancia (>1000 km). En general, los congéneres de PBDEs son compuestos hidrofóbicos y lipofílicos, con baja solubilidad en agua y bajas presiones de vapor, sin embargo, estas propiedades físico-químicas dependerán del número de bromos de la molécula. Por tanto, la partición de los congéneres de PBDEs entre la fase gaseosa y particulada del aire irá en consonancia con sus respectivas presiones de vapor. A una presión y temperatura estándar, los mono- a los tri-BDEs se encuentran principalmente en la fase gaseosa de aire, los tetra- y penta-BDEs se dividen entre la fase gaseosa y la particulada, y a partir de los hexa-BDEs hasta el deca-BDE BDE se encuentran mayoritariamente en la fase particulada del aire (EPA 2010). En el caso de las PFAS, las sustancias alquil perfluoradas ácidas (PFAAs) o más comúnmente denominadas iónicas, presentan valores orientativos de pKa menores de 1.6, por lo que son ácidos fuertes, y prácticamente, se encuentran en el agua, medio ambiente y matrices biológicas, en su forma aniónica, la cual es soluble en agua (ITRC 2017). Por tanto, las PFAAs son más solubles en agua y menos volátiles que las PFAS neutras. Sin embargo, se ha encontrado que el mayor reservorio ambiental de las

PFAAs es el aire y agua de océanos de lugares remotos como el Ártico. Por tanto, se sabe que estas sustancias sufren transportes a largas distancias, pero no está del todo claro el mecanismo a través del cual se transportan. Se cree, aunque todavía existen dudas al respecto, que las PFAS neutras, al ser altamente volátiles, son las realmente susceptibles de ser transportadas a largas distancias a través de la atmósfera, y que estas sustancias se degradan en la misma para dar lugar a las PFAAs, que se depositan por vía húmeda o seca en los océanos (Wong et al. 2018; Yeung et al. 2017). En cuanto a su partición entre la fase gaseosa y particulada del aire, las PFAS iónicas se encuentran principalmente en la fase particulada, al contrario de lo que ocurre con las neutras, que se encuentran en la fase gaseosa del aire (Yao et al. 2017).

En los últimos años tanto la mayoría PFAS iónicas como de PBDEs, han sido reconocidos como altamente persistentes, potencialmente bioacumulativos y tóxicos. Además, muchos de ellos han sido detectados globalmente en el medio ambiente. Se ha pretendido por ello potenciar el desarrollo de metodologías para su análisis, así como propiciar procesos regulatorios y programas nacionales e internacionales con el objetivo de reducir las emisiones y el contenido de estos contaminantes más relevantes (OECD 2013; EPA 2010).

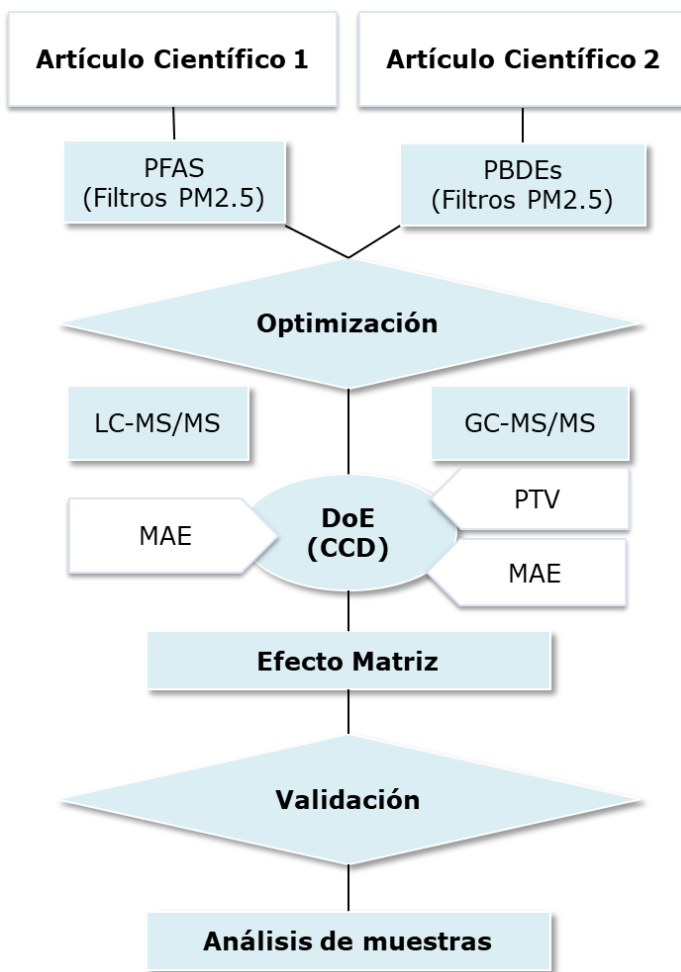
En la última década la tendencia en cuanto a metodologías analíticas es la de reducir tanto el tiempo de análisis como el volumen de disolventes, por tanto, no es de extrañar que una de las técnicas de extracción a tener en cuenta para el análisis de ciertos contaminantes emergentes sea la extracción asistida con microondas. La energía de microondas calienta un disolvente polar en contacto con la muestra sólida o líquida para favorecer la separación de los analitos de la matriz de la muestra. La generación de calor en la muestra dentro del microondas requiere de la presencia de un compuesto dieléctrico. Cuanto mayor sea la constante dieléctrica de dicho compuesto, mayor será la energía térmica liberada y por tanto, más rápido se dará el calentamiento. Por ello, es conveniente el uso de disolventes o mezcla de disolventes con una apropiada permitividad o constante dieléctrica, sin perder de vista, que los analitos deben tener una elevada afinidad hacia el disolvente de extracción. Además del disolvente de extracción, los parámetros a tener en cuenta para una adecuada optimización de la etapa de extracción son el tiempo, la temperatura y el volumen de disolvente (Sanchez-Prado et al. 2015).

En cuanto a las técnicas cromatográficas utilizadas para el desarrollo de los dos estudios incluidos en el presente capítulo de esta **Tesis Doctoral**, como ya se ha



comentado en la introducción general, la cromatografía líquida es clave para la determinación de las PFAS iónicas en cualquier tipo de matriz, mientras que la cromatografía de gases lo es para la determinación de los PBDEs. Ambas técnicas cromatográficas acopladas a la espectrometría de masas en tándem confieren a la metodología utilizada de una elevada selectividad, sensibilidad y reproducibilidad. Sin embargo, para obtener estas características es necesario tener en cuenta ciertos aspectos dependiendo de la cromatografía utilizada. Por ejemplo, para la cromatografía líquida, además de la columna cromatográfica, la fase móvil y el gradiente utilizado, uno de los principales aspectos a tener en cuenta es el efecto matriz, para el cual se pueden realizar algunas aproximaciones para reducirlo o compensarlo, como por ejemplo, la aplicación de técnicas de purificación, el uso de patrones internos, o la cuantificación mediante calibrado en matriz. Sin embargo, para la cromatografía de gases en muestras complejas, suele ser requisito la aplicación de etapas de purificación con el fin de conseguir un buen funcionamiento del equipo GC-MS/MS, es decir, para conseguir mantener la robustez del equipo, y por tanto, la reproducibilidad de la nueva metodología desarrollada. Además de ello se requiere prestar una especial atención tanto al modo de inyección en el GC, como a los parámetros característicos de la misma, tal y como ya se ha mencionado en la introducción general.

En el presente capítulo, se presentan dos trabajos, **Artículo Científico 1** y **Artículo Científico 2**, en los que se muestran el desarrollo y validación de dos metodologías analíticas diferentes para la determinación de dos familias de compuestos, PFAS iónicas y PBDEs, ambas incluidas ya en el grupo de los contaminantes emergentes, mediante el uso de la optimización multivariante en algunas de las etapas más relevantes de cada una de las nuevas metodologías. En **la Figura 11**, se puede apreciar el esquema de la estrategia seguida en ambos estudios.



**Figura 11.** Estrategias de trabajo seguidas en ambos estudios.

2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 1

Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 4847–4855



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

Journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)



Determination of per- and polyfluorinated substances in airborne particulate matter by microwave-assisted extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Maria Isabel Beser<sup>a</sup>, Olga Pardo<sup>a</sup>, Joaquim Beltrán<sup>b</sup>, Vicent Yusà<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Public Health Research Center of Valencia (CSISP), Av. Catalunya, 21, 46020 Valencia, Spain

<sup>b</sup> Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

ARTICLE INFO

Article history:  
Available online 7 May 2011

Keywords:  
PFCs  
PFAS  
PM2.5  
MAE  
LC–MS/MS  
Experimental design

ABSTRACT

A sensitive and confirmatory analytical method has been developed for the determination of 12 ionic per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) in fine airborne particulate matter (PM2.5) at trace levels. The proposed method includes extraction of PM2.5-bound PFAS by microwave-assisted extraction (MAE) followed by centrifugation and injection into the liquid chromatograph coupled to a triple quadrupole tandem mass spectrometry system (LC–MS/MS). The main parameters affecting the performance of MAE were optimised using statistical design of experiments (DoE). Recoveries ranged from 83 to 120% and the method quantification limit (MQL) was 1.4 pg m<sup>-3</sup>, when air volumes of 720 m<sup>3</sup> were sampled. This method was successfully applied to 41 samples collected from five stations of the monitoring network of the Valencian Regional Government (Spain) during April–July 2010. Eight out of 12 PFCs investigated were quantified in at least one sample (PFBA, PFPeA, PFHxS, 6:2 FTIS, PFOA, PFNA, PFOS and PFDA). The measured concentrations ranged from 1.4 to 34.3 pg m<sup>-3</sup>.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) comprise a large group of industrial chemicals, consisting of a hydrophobic alkyl chain usually attached to a hydrophilic head. The alkyl chain is partly or fully fluorinated and typically contains between 4 and 18 carbon atoms. Due to their distinctive physical–chemical properties, PFAS have been and are still being used widely in a variety of domestic and industrial applications such as polymerisation aid for production of fluorinated polymers, surface treatment of textiles, paper, carpet and leather or performance chemicals, such as aqueous film forming foam for firefighting and herbicides/insecticides [1].

Concerns about the persistence and bioaccumulative properties of PFAS were raised when the widely used surfactant perfluorooctanate sulfonate (PFOS) was found to be ubiquitous in wildlife and human populations worldwide [2,3]. These compounds have entered the environment from all stages: the production of PFAS, application to products and use and disposal of these products. Jahnke et al. reported that numerous ionic PFAS such as perfluoroalkane sulfonates (PFASs) and perfluoroalkyl carboxylates (PFCAs), show extreme persistence due to the exceptional stabil-

ity of the carbon–fluorine bond [4]. Additionally, several of these compounds were found to be accumulative [5] and toxic [6]. Therefore, PFOS, has been added to the persistent organic pollutants list. Findings of non-volatile ionic PFAS in the particle fraction of air samples in remote locations indicate that they undergo significant atmospheric transport on aerosols [7]. Consequently more atmospheric measurements of ionic PFAS are strongly recommended. On the other hand, volatile neutral PFAS are usually not environmentally persistent [4] and they are suggested to be precursors of persistent, ionic ones [8–11].

The distribution of PFAS among gas and particulate phase of air depends on the physical–chemical properties of the compound considered, such as vapour pressure and water solubility. It is also influenced by environmental factors, especially temperature, humidity and the nature and concentration of suspended particulate matter. While neutral PFAS are pre-eminently in the gas phase, ionic PFAS are present mainly in the particulate phase owing to their low volatility [7,12]. However their ambient particle and gas phase concentrations may be biased by the sampling process [13]. Atmospheric particulate matter (PM) is made up of a mixture of solid and aqueous species which enter the atmosphere by anthropogenic and natural pathways and present a range of morphological, physical and chemical properties in different areas [14]. The organic fraction is especially complex and contains hundreds of organic compounds [15]. The selection of PM10 and PM2.5 (fraction of particulate matter with aerodynamic diameter range

\* Corresponding author. Tel.: +34 961925865; fax: +34 961925888.  
E-mail address: [yusa.vic@gva.es](mailto:yusa.vic@gva.es) (V. Yusà).



*Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 4847-4855*

**Determination of per- and polyfluorinated substances in airborne particulate matter by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry**

Maria Isabel Beser<sup>a</sup>, Olga Pardo<sup>a</sup>, Joaquim Beltrán<sup>b</sup>, Vicent Yusà<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Public Health Research Center of Valencia (CSISP), Av. Catalunya, 21, 46020 Valencia, Spain

<sup>b</sup> Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

---

**ABSTRACT**

A sensitive and confirmatory analytical method has been developed for the determination of 12 ionic per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) in fine airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) at trace levels. The proposed method includes extraction of PM<sub>2.5</sub>-bound PFAS by microwave-assisted extraction (MAE) followed by centrifugation and injection into the liquid chromatograph coupled to a triple quadrupole tandem mass spectrometry system (LC-MS/MS). The main parameters affecting the performance of MAE were optimised using statistical design of experiments (DoE). Recoveries ranged from 83 to 120% and the method quantification limit (MQL) was 1.4 pg m<sup>-3</sup>, when air volumes of 720 m<sup>3</sup> were sampled. This method was successfully applied to 41 samples collected from five stations of the monitoring network of the Valencian Regional Government (Spain) during April–July 2010. Eight out of 12 PFCs investigated were quantified in at least one sample (PFBA, PFPeA, PFHxS, 6:2 FTS, PFOA, PFNA, PFOS and PFDA). The measured concentrations ranged from 1.4 to 34.3 pg m<sup>-3</sup>.

**Keywords:** PFCs, PFAS, PM<sub>2.5</sub>, MAE, LC-MS/MS, Experimental design.

**1. Introduction**

Per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) comprise a large group of industrial chemicals, consisting of a hydrophobic alkyl chain usually attached to a hydrophilic head. The alkyl chain is partly or fully fluorinated and typically contains between 4 and 18 carbon atoms. Due to their distinctive physical-

chemical properties, PFAS have been and are still being used widely in a variety of domestic and industrial applications such as polymerisation aid for production of fluorinated polymers, surface treatment of textiles, paper, carpet and leather or performance chemicals, such as aqueous film forming foam for firefighting and herbicides/insecticides [1].

Concerns about the persistence and bioaccumulative properties of PFAS were raised when the widely used surfactant perfluorooctanate sulfonate (PFOS) was found to be ubiquitous in wildlife and human populations worldwide [2,3]. These compounds have entered the environment from all stages: the production of PFAS, application to products and use and disposal of these products. Jahnke et al. reported that numerous ionic PFAS such as perfluoroalkane sulfonates (PFASs) and perfluoroalkyl carboxylates (PFCAs), show extreme persistence due to the exceptional stability of the carbon-fluorine bond [4]. Additionally, several of these compounds were found to be accumulative [5] and toxic [6]. Therefore, PFOS, has been added to the persistent organic pollutants list. Findings of non-volatile ionic PFAS in the particle fraction of air samples in remote locations indicate that they undergo significant atmospheric transport on aerosols [7]. Consequently more atmospheric measurements of ionic PFAS are strongly recommended. On the other hand, volatile neutral PFAS are usually not environmentally persistent [4] and they are suggested to be precursors of persistent, ionic ones [8–11]. The distribution of PFAS among gas and particulate phase of air depends on the physical-chemical properties of the compound considered, such as vapour pressure and water solubility. It is also influenced by environmental factors, especially temperature, humidity and the nature and concentration of suspended particulate matter. While neutral PFAS are pre-eminently in the gas phase, ionic PFAS are present mainly in the particulate phase owing to their low volatility [7,12]. However their ambient particle and gas phase concentrations may be biased by the sampling process [13]. Atmospheric particulate matter (PM) is made up of a mixture of solid and aqueous species which enter the atmosphere by anthropogenic and natural pathways and present a range of morphological, physical and chemical properties in different areas [14]. The organic fraction is especially complex and contains hundreds of organic compounds [15]. The selection of PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub> (fraction of particulate matter with aerodynamic diameter range smaller than 10 and 2.5  $\mu\text{m}$ , respectively) rather than total suspended particulate (TSP) matter, as indicators of air

pollution are based on health considerations, since the fine fraction of PM is the most dangerous for human health and environment. Likewise, the comparability among studies is improved if PM<sub>10</sub> or PM<sub>2.5</sub> is used instead of bulk samplers. The regulatory concern is today focused on those particles small enough to enter the thoracic region (respirable fraction) [16,17]. The extraction of ionic PFAS from airborne particulate matter has been carried out by a mechanical shaker using MeOH, by sonication with MeOH as the extraction solvent or by pressurized liquid extraction (PLE) [4]. Also, fluidized bed extraction has been applied [18]. It is well known that microwave assisted extraction (MAE), like PLE, allows reduction of extraction time and organic solvent consumption, and increases sample throughput in the extraction of different pollutants from environmental matrices [19]. Nevertheless, to our knowledge, no articles have been published related to extraction of PFAS from filters (particle phase) or adsorbents (gas phase) using MAE.

PFAS analysis is commonly performed by gas chromatography (GC) (neutral substances) and liquid chromatography (LC) (ionic substances) coupled to mass spectrometry. Environmental monitoring of PFAS has improved by recent developments in LC-MS/MS technology [20]. Jahnke and Berger [4] have recently reviewed the state-of-the-art in trace analysis of PFAS in different environmental matrices, including air. The purpose of this study was to investigate the feasibility of using microwave energy for the efficient extraction of 12 ionic PFAS from fine airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) and develop a sensitive and confirmatory method that could be used in ambient air monitoring programs and health risk studies. The procedure includes extraction of PM<sub>2.5</sub>-bound PFAS by MAE followed by a centrifugation step and injection into a liquid chromatograph coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. The method was applied to several samples of PM<sub>2.5</sub> filters collected from the monitoring network of the Valencian Regional Government (Spain).

## **2. Experimental**

### **2.1. Standards and solvents**

Methanol LC-MS grade and diethylene glycol for analysis was supplied by Panreac (Barcelona, Spain) and ultrapure water was obtained from a Milli-Q filter

system (Millipore, Bedford, MA, USA). Ammonium acetate, HPLC grade, was from Sharlau (Barcelona, Spain).

Stock standards containing 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of perfluorobutanoic acid (PFBA, >98%), perfluoropentanoic acid (PFPeA, >98%), perfluorohexanoic acid (PFHxA, >98%), perfluoroheptanoic acid (PFHpA, >98%), perfluorooctanoic acid (PFOA, >98%), perfluorononanoic acid (PFNA, >98%), perfluorodecanoic acid (PFDA, >98%), sodium perfluoro-1-butanefluorobutanoate (PFBS, >98%), sodium perfluoro-1-hexanesulfonate (PFHxS, >98%), 6:2 fluorotelomer sulfonate (6:2 FTS, >98%), sodium perfluoro-1-heptanesulfonate (PFHpS, >98%), and sodium perfluoro-1-octanesulfonate (PFOS, >98%) were obtained from Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Ontario, Canada). Individual intermediate standard solutions were prepared at a concentration of 5.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  by diluting the stock standards in methanol. A working standard solution (solution 1) containing 275  $\text{ng mL}^{-1}$  of each analyte was prepared in methanol from individual intermediate standard solutions. Mass-labelled internal stock standards at a concentration of 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of perfluoro-*n*-[1,2- $^{13}\text{C}_2$ ]hexanoic acid (MPFHxA, >98%), perfluoro-*n*-[1,2,3,4,5- $^{13}\text{C}_5$ ]nonanoic acid (MPFNA, >98%), and sodium perfluoro-1-[1,2,3,4- $^{13}\text{C}_4$ ]octanesulfonate (MPFOS, >98%) were purchased from Wellington Laboratories Inc. (Guelph, Ontario, Canada). Individual intermediate internal standard solutions of 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  were prepared by diluting the mass-labelled internal stock standards in methanol. A mix labelled standard solution (solution 2) containing 600  $\text{ng mL}^{-1}$  of every analyte in methanol was obtained from individual intermediate internal standard solutions.

## 2.2. Sampling and site characterization

PM<sub>2.5</sub> samples were collected using a high-volume sampler from Digital (Madrid, Spain) and quartz fiber filters (QFF) of 150 mm in diameter were supplied by Munktell filter AB (Falun, Sweden). A sampling flow of 30  $\text{m}^3 \text{h}^{-1}$  was used over a time period of 24 h providing a total normalized volume of filtered air around 720  $\text{m}^3$ . The filters were individually wrapped with a solvent-rinsed aluminium foil and placed in a precleaned glass jar for shipment to the lab. All samples were stored approximately at -20 °C and analysed within two months after sampling.

Air samples were collected from five stations situated in South-eastern Spain (Alicante province). Two stations were placed in Elche, a town located at the south of Alicante province. One of them was situated in a residential area (P.B., a



fire station, 0°43'03"W, 38°15'33"N). The other station (P.A., 0°40'58"W, 38°14'32"N) was placed in an industrial area. The third station was situated in a residential area of Alicante City (El Pla, 0°28'16"W, 38°21'31"N). The fourth station was located in a rural area of Pinoso, a town in the west of the province of Alicante (Pinoso, 1°03'53"W, 38°27'06"N). The last station was installed in a residential area of Alcoy, a town in the Northern Alicante province. A total of 41 samples were collected from April to July 2010.

To perform the PM<sub>2.5</sub> determination, a micro-balance MX5 from Mettler-Toledo (Bedford, MA, USA) was used. Filters were previously conditioned according to EN 12341:1998 standard, at temperature ( $20 \pm 1$  °C) and at relative humidity ( $50 \pm 5\%$ ) conditions for at least 48 h, and then weighed. Prior to weighing, filters were heated during 24 h at 300 °C to eliminate organics.

### 2.3. MAE conditions

Prior to extraction filters were fortified with 16.7 µL using an electronic pipette with volume range of 2 - 20 ± 0.02 µL from Mettler Toledo (Barcelona, Spain) of mix labelled standard solution (solution 2). Extractions were carried out using a microwave assisted extraction system (ETHOS EZ, Milestone, Shelton, CT, USA) equipped with 40 mL quartz extraction vessels. Quartz vessels were used instead of Teflon in order to avoid contamination. The optimised MAE conditions were as follows: 120 °C for 2 min, using 1200 W of power and 25 mL of methanol. After cooling, the vessels were taken out of the reactor and the resultant extracts (previously filtered) were evaporated to approximately 1 mL, 100 µL of diethylene glycol were added as keeper and finally the extracts were concentrated on a rotary evaporator at 50 °C (R-205 ,BUCHI Labortechnik AG, Postfach, Switzerland). Rotary evaporation was selected after a study of two evaporation methods (see Section 1 and Fig. SC-1 in Supplementary content). The obtained residues were re-dissolved with 0.5 mL of water:methanol (65:35) and transferred to eppendorf tubes. These were centrifuged for 20 min at 10,000 rpm (5415R-Eppendorf, Hamburg, Germany), and the supernatants were injected as soon as possible in the LC-MS/MS system, because storing extracts in the freezer results in precipitation and potential losses of PFAS.

**Table 1.**

Selected experimental parameters of LC-MS/MS for each PFAS.

Analyte	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision Energy (V)	Tube Lenses (V)
PFBA	4.38	<b>212.9</b>	<b>169.0</b>	12	72
		212.9	119.0	25	72
PFPeA	8.10	<b>262.9</b>	<b>219.2</b>	11	72
PFBS	8.87	<b>298.9</b>	<b>80.0</b>	38	101
		298.9	98.9	32	101
		298.9	169.0	26	101
PFHxA	11.74	312.9	119.0	27	78
		<b>312.9</b>	<b>269.1</b>	11	78
PFHpA	14.49	362.9	169.0	18	100
		<b>362.9</b>	<b>319.0</b>	12	100
PFHxS	14.73	<b>398.9</b>	<b>79.9</b>	44	228
		398.9	98.9	39	228
		398.9	169.0	33	228
6:2 FTS	16.69	426.8	80.9	44	93
		<b>426.8</b>	<b>407.1</b>	26	93
PFOA	16.79	412.9	169.0	20	100
		<b>412.9</b>	<b>369.1</b>	13	100
PFHpS	16.83	<b>448.9</b>	<b>79.9</b>	46	122
		448.9	98.9	44	122
		448.9	168.9	43	122
PFNA	18.74	462.9	219.0	20	115
		<b>462.9</b>	<b>419.2</b>	13	115
PFOS	18.64	<b>498.8</b>	<b>79.9</b>	49	129
		498.8	98.9	45	129
		498.8	169.0	37	129
PFDA	20.20	512.9	269.1	19	124
		<b>512.9</b>	<b>469.2</b>	14	124
MPFHxA	11.64	<b>314.9</b>	<b>270.0</b>	12	102
MPFNA	18.63	<b>467.9</b>	<b>423.2</b>	15	113
MPFOS	18.67	<b>502.9</b>	<b>99.0</b>	48	129

In bold: Quantification transition

#### 2.4. Liquid chromatography–mass spectrometric determination

The LC–MS system consists of a Finnigan Surveyor Autosampler, a Finnigan Surveyor LC Pump and a Finnigan TSQ Quantum Ultra detector (San José, CA, USA). Separation was accomplished on a Luna C-18 column, 150 mm × 2 mm I.D., 5 µm from Phenomenex (Macclesfield, UK).

Chromatography was performed using water(A)–methanol(B) both containing 5 mM of ammonium acetate at a flow rate of 300 µL min<sup>-1</sup>. The gradient conditions were as follows: 0–23 min, linear from 35 to 90% B; 23–24 min, isocratic 90% B; 24–27 min, linear from 90% to 35% B; 27–32 min, isocratic 35% B.

The autosampler and column temperatures were set at 15 °C and 25 °C, respectively. The injection volume was 10 µL.

All PFAS were detected using electrospray ionisation (ESI) in negative mode. Multiple reaction monitoring (MRM) was selected as acquisition mode. Nitrogen Alfacas B50 (99.999%) was used for drying and nebulising. Argon C50 (99.999%) was used as the collision gas. Both gases were from Air Liquide (Madrid, Spain). The optimised operating conditions were as follows: sheath gas 35 psi, capillary temperature 350 °C, spray voltage 3500 V, auxiliary gas value 5 arbitrary units (au) and collision gas pressure was 1.5 mTorr. Collision energy and tube lens offset voltages were optimised for each compound using the automated optimisation procedure in syringe infusion mode provided by the manufacturer. **Table 1** shows these experimental parameters and the monitored transitions for each analyte.

For quantification, calibration curves consisted of 6 points that ranged from 2 to 50 ng mL<sup>-1</sup>. MPFHxA was used as internal standard for PFBA, PFPeA, PFBS, PFHxA, PFHpA and PFHxS; MPFOS was employed for PFOS and PFDA whereas MPFNA was the internal standard for PFHpS and PFNA. Nevertheless, for 6:2 FTS and PFOA appropriate <sup>13</sup>C analogues were not available in the laboratory at the time of the study and therefore the quantification of these PFAS was performed by external calibration. All samples concentrations reported were field blank-corrected. As to the samples, diethylen glycol was added to the calibration standards.

## 2.5. Validation study and quality control protocol

Reference materials for PFAS in fine airborne particulate matter are not available. Thus, method validation was carried out using spiked blank samples (field blank PM<sub>2.5</sub> filters). To obtain blank samples, PM<sub>2.5</sub> samples were collected in rural stations and then heated at 150 °C for 24 h, before fortification with the working standard solution (solution 1) of PFAS. The absence of detectable quantities of PFAS was checked in each lot of field blank samples prepared.

The following parameters were studied in order to ensure the method quality: linearity, accuracy (measured as mean recovery), precision (expressed as repeatability), selectivity, and method quantification limit (MQL).

Linearity of the method was evaluated with triplicated six point calibration curves (2, 4, 6, 10, 30 and 50 ng mL<sup>-1</sup>) in water:methanol (65:35). Accuracy and precision were determined by analysing spiked field blank samples at three different concentrations (1.4, 14, 34.7 pg m<sup>-3</sup>). The analytical schedule was three days and 3 replicates each day.

The MQL was established as the lowest level validated, that is the lowest concentration tested for which recovery and precision were satisfactory (80–120% and <20% RSD, respectively), and the two diagnostic ions fulfil the confirmatory criteria. For a positive identification (confirmation criteria) in accordance with the EU guidelines [21], the following rules have been applied: (i) two transitions per compound must be monitored except for PFPeA in which one transition has been monitored, (ii) the LC retention time of the analyte in the sample must be within 2.5% of retention time in the standard, (iii) the relative abundance of the MRM transitions signals must be within 20% of the ratio obtained for the standards, and (iv) the S/N of the two diagnostic ions must be >3. The method detection limit (MDL), was estimated as the analyte concentration giving a peak of three times the background noise in the chromatograms corresponding to the MQL level.

Each set of filters was analysed under quality assurance protocols, including process blanks, spiked blanks and reagent blanks. In order to determine pollutant backgrounds, a procedural blank was employed as a control and was treated in the same way as the samples. Teflon bottles, Teflon-lined caps, Teflon vessels, and other materials suspected of containing fluoropolymer were avoided

throughout the analysis in order to prevent contamination during the process [22].

Statistical data manipulation and numerical analysis of data resulting from experimental design were carried out by means of the statistical package MINITAB for Windows, Release 14 (Minitab Inc., Birmingham, UK).

### **3. Results and discussion**

#### **3.1. Optimisation of LC-MS/MS conditions**

##### *3.1.1. LC*

Mobile phase composition are known to have a significant effect on LC-MS/MS performance, either in getting suitable chromatographic peaks or in signal sensitivity, consequently adequate modifiers could be added to the mobile phase in order to obtain efficient chromatography and to favour ionisation [23]. For this reason, two different mobile phases and several buffer compositions were tested.

Methanol:water and acetonitrile:water were studied as mobile phases for the PFAS separation, working with the gradient conditions described by Ericson et al. [24] and Powley et al. [25], respectively. Better chromatographic profiles (less background noise and peak widths) were obtained when methanol:water was used, so this mobile phase was selected (see Section 2.4).

Six different buffer compositions were tested: 2 mM ammonium acetate, 5 mM ammonium acetate, 10 mM ammonium acetate, 0.1% acetic acid with 5 mM ammonium acetate, 0.2% acetic acid with 5 mM ammonium acetate and 0.3% acetic acid with 5 mM ammonium acetate. In general, the highest signals were achieved with the 5 mM ammonium acetate buffer, without acetic acid addition. For all analytes, a decreasing in the response was observed when increasing acetic acid concentration, except PFHpA and PFHxS for which significant differences were not found. In accordance with these, 5 mM ammonium acetate was added to both aqueous and organic mobile phases. Some responses of some PFAS are shown, as an example, in Tables SC-1a and 1b.

##### *3.1.2. MS/MS parameters*

Precise optimisation of MS/MS parameters is needed in order to maximize the signal of the different PFAS. The first step of the MS/MS optimisation was to

select the most abundant ion from the full scan spectra as precursor ion. This was carried out by infusing 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  standard of each compound prepared in methanol at 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . MS/MS spectra were acquired as well to obtain information about the maximum number of transitions available for each compound. The most sensitive results were always obtained with ESI in the negative ionisation mode, using the  $[\text{M}-\text{H}]^-$  as a precursor ion. The most sensitive transitions were utilized for quantification and the secondary transitions were used for confirmatory purposes. The quantification transitions for PFCAs and PFSA s correspond to the typical fragments  $m/z$   $[\text{M}-\text{COOH}]^-$  and  $m/z$   $[\text{SO}_3]^-$ , respectively [26], except 6:2 FTS, for which  $m/z$   $[\text{M}-\text{HF}]^-$  was chosen. Confirmatory transitions corresponded to  $m/z$   $[\text{C}_2\text{F}_5]^-$  for PFBA and PFHxA,  $m/z$   $[\text{C}_3\text{F}_7]^-$  for PFHpA and PFOA,  $m/z$   $[\text{C}_4\text{F}_9]^-$  for PFNA and  $m/z$   $[\text{C}_5\text{F}_{11}]^-$  for PFDA. On the other hand,  $m/z$   $[\text{FSO}_3]^-$  was selected as confirmatory transition for all the PFSA s [26], except in the case of 6:2 FTS for which  $m/z$   $[\text{HF}]^-$  was used.

When acquiring in multiple reaction monitoring (MRM) mode it is important to maximize chromatographic signal to noise ratios and it is also important that the peak to be quantified be defined by at least 12 data points to assure a satisfactory peak shape and a reproducibility of area measurement. Accordingly, three time windows (segments) with dwell time of 500 ms were selected. Likewise, the distributing of the analytes along the time windows try to centre the chromatographic peak in windows, minimizing the risk of peak loss due to unexpected slight changes in retention time. Collision energy and tube lenses were optimised automatically for the different PFAS using the procedure by syringe infusion mode provided by the manufacturer.

### 3.2. Optimisation of MAE conditions

To obtain acceptable recoveries, an extraction procedure is needed to quantitatively remove PFAS from fine particulate matter. MAE is an attractive alternative to conventional techniques, and it has been successfully applied to the extraction of different families of emerging pollutants (including compounds with very different physicochemical properties), from a wide range of environmental samples [27]. It is a well-known fact that microwave-assisted extraction (MAE) allows reduction of both extraction time and organic solvent consumption and increases sample throughput. However, to our knowledge, MAE has neither been applied to the extraction of PFAS from particulate matter nor to other matrices.

The most commonly used extraction vessels for microwave extraction are made of Teflon, a polyfluorinated polymer, which often results in contamination of the matrix. In this study, Teflon vessels have been replaced by quartz ones in order to avoid contamination of samples. The main parameters influencing MAE performance such as solvent, temperature, time and extraction volume [28] were optimised.

### *3.2.1. Study of extraction solvents*

In order to select an appropriate solvent for quantitative extraction of all PFAS from atmospheric particulate matter, a comparative study was performed using three different solvents commonly employed in extraction of these compounds from environmental matrices: acetone, ethyl acetate and methanol. These three solvents possess a suitable polarity and a proper permittivity ( $\epsilon$ ) to absorb the microwave energy and to transform it into thermal energy [29]. Furthermore, these solvents have been described to have a high selectivity towards the analytes of interest [4].

Microwave extractions were performed on spiked field blank filters (5 ng filter<sup>-1</sup>) with one 15-min cycle, using 30 mL of each solvent and an extraction temperature of 50 °C. **Table 2** illustrates the effect of the three solvents on the absolute recoveries of the different PFAS, extracted from PM<sub>2.5</sub> filters. Statistical analysis of the obtained data was carried out using a two-sample t-test approach at 95% significance level. Ethyl acetate was discarded as extraction solvent because statistically lower recoveries were obtained for most of the compounds, especially for long chain ones. Significant differences between acetone and methanol were not observed (t-test). Nevertheless, with (5–18% RSD) methanol provided, in general, more precise results and higher signal to noise responses than acetone (1–23% RSD) due to less ion suppression effects. Therefore, it was selected as extraction solvent. This is in accordance with the review carried out by Jahnke and Berger [4], where ionic PFAS were extracted from different matrices using methanol as extraction solvent.

### *3.2.2. Optimisation of MAE parameters*

Once methanol was selected as extraction solvent, the optimisation of the three main factors affecting MAE recoveries (solvent volume, exposure time and temperature) was carried out by a design of experiment approach (DoE) using a central composite design (CCD) [30]. This type of experimental design permits to

build the response surface for each compound, and finding the factor settings (operating conditions) that maximize the extraction efficiency. The CCD consisted of a full factorial  $2^3$  design (8 hypercube points), 6 axial points and 6 central points in the cube. The 20 runs were randomized to provide protection against the effects of hidden variables, and were carried out with spiked field blank PM<sub>2.5</sub> filters (5 ng filter<sup>-1</sup>). The design matrix and the analytical response of three compounds (PFHxA, PFOS and PFOA), as an example, are shown in **Table 3**. The responses of the remaining nine compounds appear in Table SC-2 of Supplementary content. The microwave power was fixed to 1200 W.

**Table 2.** Effect of solvent on absolute recoveries of PFAS from spiked PM<sub>2.5</sub> filters (n = 3).

	Acetone		MeOH		Ethyl acetate	
	Recoveries (%)	RSD (%)	Recoveries(%)	RSD (%)	Recoveries (%)	RSD (%)
PFBA	91	10	104	8	75	30
PFPeA	130	7	122	6	124	23
PFBS	103	1	106	7	94	24
PFHxA	111	12	97	9	91	35
PFHpA	87	10	82	5	70	25
PFHxS	107	12	95	11	91	20
6:2 FTS	54	23	61	18	23	37
PFOA	81	5	75	11	68	41
PFHpS	45	22	56	8	12	35
PFNA	51	9	57	5	40	32
PFOS	52	17	67	13	19	40
PFDA	49	8	54	7	14	26

RSD: relative standard deviation

**Table 3.** Experimental conditions of the Central Composite Design (CCD) used for the optimisation of MAE conditions and obtained responses (as peak area in arbitrary units) for PFHxA, PFOS and PFOA.

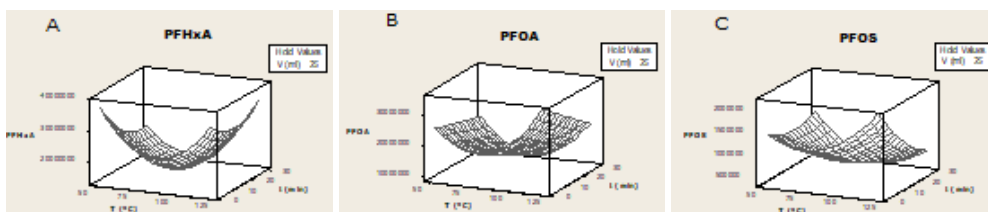
Run Order	Temperature	Time	Volume	Response (10 <sup>6</sup> )		
	(°C)	(min)	(mL)	PFHxA	PFOS	PFOA
1	85	16	20	14.7	0.9	14.2
2	85	16	30	17.9	0.4	16.9
3	85	16	20	7.8	0.3	8.0
4	64	8	14	29.0	0.7	20.0
5	106	8	26	24.2	1.4	22.4
6	85	16	20	20.1	0.2	13.8



<b>7</b>	85	16	20	17.7	0.8	18.2
<b>8</b>	106	24	26	15.3	0.4	9.9
<b>9</b>	85	16	10	5.9	0.4	5.3
<b>10</b>	64	24	26	17.2	1.1	14.2
<b>11</b>	50	16	20	27.0	1.0	25.2
<b>12</b>	120	16	20	29.0	1.5	29.8
<b>13</b>	106	8	14	17.8	0.6	15.3
<b>14</b>	64	8	26	16.5	1.0	11.6
<b>15</b>	106	24	14	25.3	0.9	21.8
<b>16</b>	85	30	20	16.0	0.7	12.6
<b>17</b>	64	24	14	17.0	0.8	17.3
<b>18</b>	85	16	20	16.3	1.1	20.2
<b>19</b>	85	2	20	23.3	1.0	20.3
<b>20</b>	85	16	20	16.0	0.9	16.1

A three-dimensional response surface shows the effect of two independent variables on a given response, at a constant value of the other independent variable. **Fig. 1** presents, as an example, some response surfaces developed by the model for PFHxA (m/z 269.1), PFOS (m/z 79.9) and PFOA (m/z 369.1) at a constant value of solvent volume (25 mL).

To select the factors setting that maximize the twelve compound responses, the “response optimiser” from response surface design in MINITAB program was used. This parameter maximizes simultaneously the desirability for each compound. The optimised factor settings were exposure time of 2 min, temperature of 120 °C and solvent volume of 25 mL. These conditions provide a composite desirability of 0.998.



**Fig. 1.** Response surfaces obtained for (A) PFHxA, (B) PFOA and (C) PFOS. Fixed conditions: volume, 25 mL methanol.

### 3.3. Matrix effect

Signal suppression or enhancement of the analyte signal as a result of matrix effect (ME) can severely compromise quantitative analysis of the PFAS at trace levels. In LC–MS/MS, both in ESI or APCI ionisation modes, the coextractive matrix components can lead to this effect as a consequence of the interferences in the ionisation mechanism of the analytes [31]. Matrix effects must be evaluated and discussed in the context of method development and appropriate calibration techniques compensating for these effects should be used, if necessary.

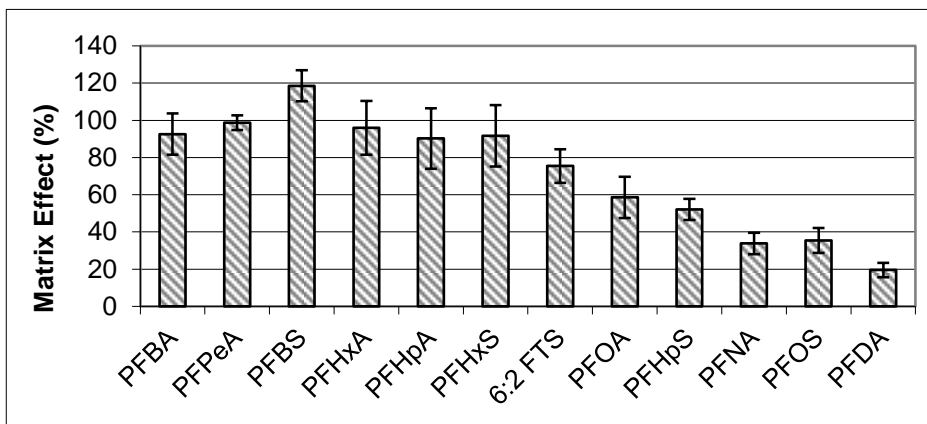
The matrix effect was evaluated by comparing the peak areas from standard solutions ( $n = 5$ ) of the 12 PFAS in mobile phase (set A) with the peak areas of spiked blank PM<sub>2.5</sub> filter extracts (set B) [32]. The matrix effect was calculated via the formula:

$$\text{ME\%} = \frac{B}{A} \times 100$$

Both A and B sets had concentrations of 10 ng mL<sup>-1</sup>.

The results obtained are shown in **Fig. 2**. As can be seen, predominantly ion suppression was found in long chain PFAS. The range of matrix effect (mean values) was from 119% (PFBS) to 20% (PFDA). Strongest suppression was observed for PFNA, PFOS and PFDA.

Other PFAS displayed moderate ion suppression ranging (mean values) from 99% (PFPeA) to 75% (6:2 FTS). When the average matrix is lower than 80%, it can generally be considered to have a significant effect on the quantitative analytical results. In general, the ME can be reduced by removing the co-eluting matrix components with an appropriate clean-up step. In this case, with a centrifugation step the ion suppression was removed for the most of PFAS (see Section 3.4). A compensation approach, such as the use of internal standards, is also considered a useful method to eliminate also the consequences of matrix effects on the reliability (accuracy and precision) of the data.



**Fig. 2.** Experimental matrix effect obtained for PFAS. Mean values are plotted together with the relative standard deviations (N=5).

### 3.4. Clean-up procedure

In order to reduce the matrix effect, the introduction of a clean-up step was studied. Dispersive solid-phase extraction was tested using graphitized carbon and C<sub>18</sub> as adsorbents, with and without adding 50 µL of glacial acetic acid [33] and the results were compared with those obtained by centrifugation. As an example, mean absolute recoveries obtained for the tested clean-up procedures with acetic acid addition are shown in **Table 4**. C<sub>18</sub> was discarded as adsorbent, because significantly lower recoveries ( $p < 0.05$ ) for most of the compounds studied were obtained using it. On the other hand, significant differences between recoveries obtained by graphitized carbon and those reached by centrifugation, both with acetic acid, were not observed. Similar results were obtained without acetic acid addition. Consequently, only centrifugation was used as the clean-up procedure.

**Table 4.**  
Mean absolute recoveries (n=3) obtained with four tested clean-up.

	HAc-centrifugation		25 mg C <sub>18</sub> + HAc -centrifugation		25 mg Cgraphitized + HAc -centrifugation		Centrifugation	
	Recoveries (%)	RSD (%)	Recoveries (%)	RSD (%)	Recoveries (%)	RSD (%)	Recoveries (%)	RSD (%)
<b>PFBA</b>	108	21	86	3	113	1	103	3
<b>PFPeA</b>	99	3	83	8	119	1	110	4
<b>PFBS</b>	106	3	83	4	127	2	117	2
<b>PFHxA</b>	101	4	58	10	104	6	112	3
<b>PFHpA</b>	109	7	37	11	107	1	104	5
<b>PFHxS</b>	116	12	42	12	122	2	124	2
<b>6:2 FTS</b>	124	5	23	22	137	6	121	6
<b>PFOA</b>	98	7	15	5	95	3	105	4
<b>PFHpS</b>	111	5	14	20	97	6	114	7
<b>PFNA</b>	91	16	4	20	76	4	88	4
<b>PFOS</b>	105	23	3	38	52	10	83	6
<b>PFDA</b>	107	38	1	45	46	12	60	5

### 3.5. Analytical performance of the method

Calibration curves showed good linearity with correlation coefficients ( $R^2$ ) > 0.99 between 2 and 50 ng mL<sup>-1</sup> in water:methanol (65:35), with residues randomly distributed (without trends or patterns) and individual residual deviations less than 20%. Complete regression data are listed in Table SC-3 in the supplementary content. The selectivity of the method was satisfactory and came from the acquisition of two specific SRM transitions for each compound. LC-MS/MS chromatograms did not show the presence of interfering peaks at the analyte retention time for any of the PFAs investigated in this study.

Mean relative recoveries ranged from 83 to 120% (see **Table 5a**) with coefficients of variation below 20%. Mean absolute recoveries of mass-labelled internal standards are shown in **Table 5b**.

**Table 5a.** Accuracy expressed as average relative recovery rate and precision as relative standard deviation (RSD) from spiked PM2.5 filters. Analytical schedule: three days and 3 replicates each day.

Compounds	1ng filter <sup>-1</sup> (n=9)		5 ng filter <sup>-1</sup> (n=9)		25 ng filter <sup>-1</sup> (n=9)	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
PFBA	98	12	104	14	100	12
PFPeA	120	1	105	13	90	5
PFBS	116	10	101	16	105	11
PFHxA	109	8	101	8	88	5
PFHpA	106	8	101	8	85	5
PFHxS	110	13	115	9	92	5
6:2 FTS	118	9	89	7	82	9
PFOA	83	14	98	17	103	12
PFHpS	102	15	92	16	113	13
PFNA	117	8	93	8	96	7
PFOS	115	10	104	14	93	11
PFDA	106	15	80	3	81	12

**Table 5b.** Mean absolute recoveries and relative standard deviation of mass-labelled internal standard from spiked PM<sub>2.5</sub> filters. Analytical schedule: three days and 3 replicates each day (N=27).

Compounds	Recovery (%)	RSD (%)
MPFHxA	87	29
MPFOS	43	23
MPFNA	53	35

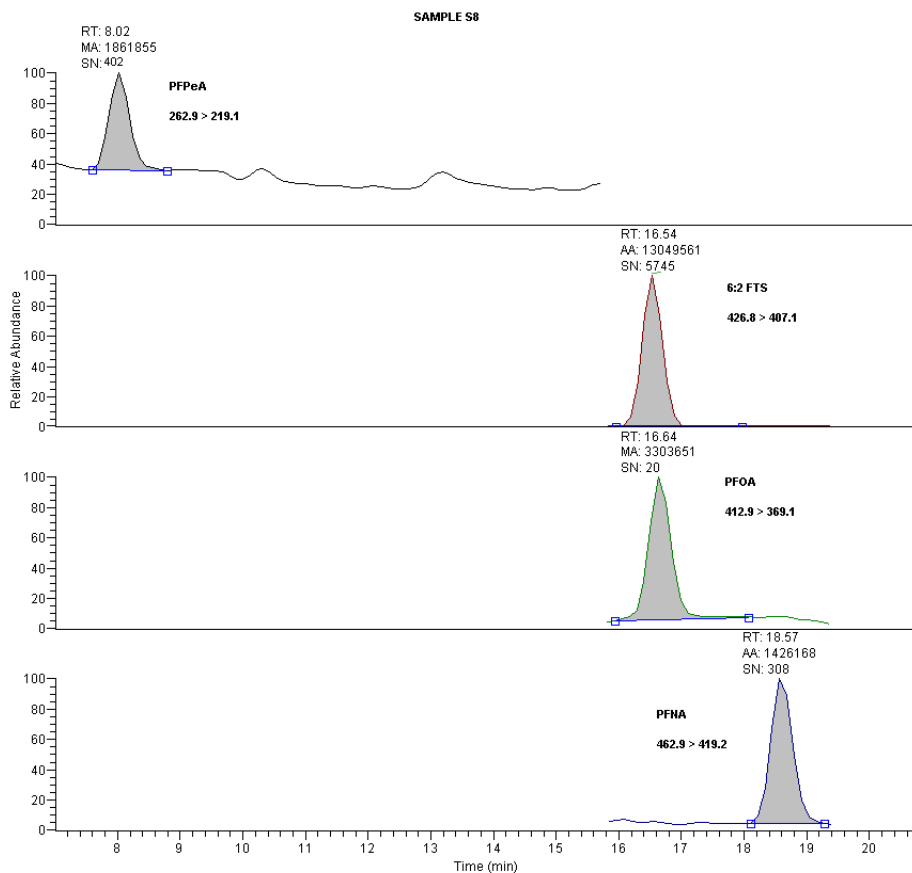
The MQL of the whole method was 1.4 pg m<sup>-3</sup>, when air volumes of 720 m<sup>3</sup> were collected. MDLs, estimated as described in Section 2.5, were from 0.03 to 0.27 pg m<sup>-3</sup> (see Table SC-3 in supplementary content).

### 3.6. Analysis of real samples

To put the developed method into practice, 41 samples were collected at five different sites (see Section 2.2). It should be pointed out that the sampling was not planned as a monitoring program to find the occurrence and variability of atmospheric PFAS, but to support the applicability of the developed method. An overview about PFAS concentrations measured is presented in **Table 6** (see also Tables SC-4–SC-8 in Supplementary content). The results corresponding to blank field samples are reported in Table SC-9 in supplementary content.

Eight out of twelve PFAS investigated were measured in at least one sample: PFBA, PFPeA, PFHxS, 6:2 FTS, PFOA, PFNA, PFOS and PFDA. The most frequently detected compound was 6:2 fluorotelomer sulfonate (61% of total samples collected), with concentrations ranging from 1.4 to 34.3 pg m<sup>-3</sup>. PFNA and PFOA were also frequently detected (59 and 54%, respectively) with concentrations ranging from 1.4 to 11.8 pg m<sup>-3</sup> and from 1.4 to 13.8 pg m<sup>-3</sup>, respectively. **Fig. 3** shows an MRM chromatogram of a sample collected in Elche – P.B during June 2010. The same compounds were detected in the particle phase of outdoor air samples in a study carried out by Barber et al. [34] in air samples collected from 4 field sites in Europe, except PFBA, PFPeA, which were not included in that study. PFOA was the predominant analyte found in the particulate phase at concentrations ranging from 1 to 818 pg m<sup>-3</sup>. In other studies carried out in

Europe [18,35–37], PFOA was often the predominant analyte measured in the particulate phase. Similar concentrations of PFOA as those found in our study were reported by Dreyer and Ebinghaus in Germany [18], ranging from 1.9 to 6.1  $\text{pg m}^{-3}$ .



**Fig. 3.** MRM chromatograms corresponding to a positive sample (S8, Elche-PB) for PFPeA ( $1.6 \text{ pg m}^{-3}$ ), 6:2 FTS ( $34.2 \text{ pg m}^{-3}$ ), PFOA ( $1.5 \text{ pg m}^{-3}$ ) and PFNA ( $1.8 \text{ pg m}^{-3}$ ).

**Table 6**  
Mean concentrations of PM<sub>2.5</sub>-bound PFAS (pg/m<sup>3</sup>) in five stations of the province of Alicante region (Spain).

No. of Samples	Elche		Elche		Alicante		Alicante		Alicante		Total		
	P.B (residential area)		P.A (industrial area)		El Pla (residential area)		Pinoso (rural area)		Alcoy (residential area)				
	N>LOQ <sup>a</sup>	Mean <sup>b</sup>	N>LOQ <sup>a</sup>	Mean <sup>b</sup>	N>LOQ <sup>a</sup>	Mean <sup>b</sup>	N>LOQ <sup>a</sup>	Mean <sup>b</sup>	N>LOQ <sup>a</sup>	Mean <sup>b</sup>			
	11	13	11	3	3	41							
PFBA	1	2.3	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	1	2	2.3
PFPeA	3	1.7	1	1.8	1	1.4	-	<1.4	-	<1.4	5	12	1.4 - 1.8
PFBS	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	-	-
PFHxA	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	-	-
PFHpA	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	-	-
PFHxS	-	<1.4	1	15.9	-	<1.4	-	<1.4	1	1.5	2	5	1.5 - 15.9
6:2FTS	8	21.5	4	3.6	9	3.1	1	1.4	3	3.5	25	61	1.4 - 34.3
PFOA	2	1.6	8	6.1	8	1.9	2	1.5	2	3.3	22	54	1.4 - 13.8
PFHpS	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	-	-
PFNA	6	2.7	9	3.8	4	1.7	2	1.65	3	2.2	24	59	1.4 - 11.8
PFOS	1	4.4	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	-	<1.4	1	2	4.4
PFDA	2	4.7	5	2.1	7	2.0	2	1.5	3	5.6	19	46	1.4 - 11.0
ΣPFAS		38.8		33.2		10.1		6.05		16.0			

<sup>a</sup> Number of samples with concentrations above LOQ.  
<sup>b</sup> Mean concentrations were calculated from values above LOQ.



Levels of PFOS ranged from 1.4 to 4.4  $\text{pg m}^{-3}$ , values that are in accordance with those reported in previous studies: PFOS levels of 2 – 7  $\text{pg m}^{-3}$  over the Great Lakes [38]; <1 – 7  $\text{pg m}^{-3}$  in Japan [39]; 0.1 – 2.3  $\text{pg m}^{-3}$  in Germany [18] and <LOQ – 7  $\text{pg m}^{-3}$  in 4 field sites in Europe [34]. Contrarily, these values are significantly lower than the levels of PFOS founded at Manchester during the period February–March 2005 (46  $\text{pg m}^{-3}$ ), the highest reported anywhere to date.

The major part of the studies carried out to measure the PFAS concentrations in air are focused on the neutral substances and those centred ionic PFAS usually analyse a reduced number of them (mainly PFOA and PFOS). Only a few authors measured levels of several ionic PFAS in air samples [18,20,34]. Likewise, it has been reported by Dreyer et al. [40] and Kim and Kannan [41] that some ionic PFAS appear in concentrations below 1  $\text{pg m}^{-3}$ . In order to quantify these low concentrations using the present analytical method, higher sampling volumes need to be collected (1500 – 2000  $\text{m}^3$ ), taking samples for 2 – 3 days.

One of the main hypotheses for the widespread detection of PFAS in remote locations is the long-range transport of neutral, volatile “precursor” PFAS in the atmosphere, followed by deposition and transformation into less volatile ionic species [8]. Nevertheless, findings of non-volatile ionic PFAS in air samples raise the possibility that they might directly undergo significant atmospheric transport on particles away from source regions [18,34].

#### 4. Conclusions

A sensitive confirmatory method to analyse 12 ionic PFAS in fine airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) has been developed. The method is based on an extraction of PFAS by MAE and determination using LC-ESI(-)-MS/MS.

Three solvents were studied for PFAS extraction. Methanol was selected because it provides more precision and higher signal to noise responses. The majority of compounds presented a matrix effect, so a centrifugation step was added as an effective clean-up method. The main parameters affecting MAE extraction (time, temperature, volume of solvent) were optimised by statistical design of experiment approach. The optimised factor setting was a time of 2 min, a temperature of 120 °C and a volume of 25 mL.

Recoveries ranged from 82 to 120% and the MQL was 1.4 pg m<sup>-3</sup>, when air volumes of 720 m<sup>3</sup> were collected. Using the optimised method PFAS concentrations were investigated in 41 samples from five stations in the atmospheric monitoring network of Valencian Regional Government (Spain). Eight out of twelve PFAS investigated were found in at least one sample: the perfluorobutanoic, perfluoropentanoic, perfluorooctanoic, perfluorononanoic and perfluorodecanoic acids and the sulfonates 6:2 fluorotelomer and sodium perfluoro-1-octane. The measured concentrations ranged from 1.4 to 34.3 pg m<sup>-3</sup>.

This method could be used in the monitoring programs of ionic PFAS in atmospheric air using the network of samplers which already exist in many countries to control fine particulate matter. However, in order to quantify with good accuracy and precision concentrations of PFAs at very low levels (<1 pg m<sup>-3</sup>), sampling volumes around 1500 – 2000 m<sup>3</sup> need to be collected.

### **Acknowledgements**

We gratefully thank Ana Miralles for technical assistance in sample preparation, Lucía Alonso and Eduardo Grañana for your collaboration in the laboratory work and to the Atmospheric Contamination Service of the Generalitat Valenciana for providing us the field samples.

### **Appendix A. Supplementary data**

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2011.04.082.

### **References**

- [1] E. Kissa, Fluorinated Surfactants and Repellents. *Surfactant Science Series*, vol. 97, second ed., Marcel Dekker, New York, 2001 (ISBN 0-8247-0472-X).
- [2] M. Houde, J.W. Martin, R.J. Letcher, K.R. Solomon, D.C.G. Muir, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 3463.
- [3] K. Kannan, S. Corsolini, J. Falandysz, G. Fillmann, K.S. Kumar, B.G. Loganathan, M.A. Mohd, J. Olivero, N.H. Yang, K.M. Aldous, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 4489.

- [4] A. Jahnke, U. Berger, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 410.
- [5] J.M. Conder, R.A. Hoke, W. De Wolf, M.H. Russell, R.C. Buck, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 995.
- [6] C. Lau, K. Anitole, C. Hodes, D. Lai, A. Pfahles-Hutchens, *J. Seed Toxicol. Sci.* 99 (2007) 366.
- [7] A. Dreyer, I. Weinberg, C. Temme, R. Ebinghaus, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 6507.
- [8] D.A. Ellis, J.W. Martin, S.A. Mabury, M.D. Hurley, M.P. Sulbaek Andersen, T.J. Wallington, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3816.
- [9] D.A. Ellis, J.W. Martin, A.O. De Silva, S.A. Mabury, M.D. Hurley, M.P. Sulbaek Andersen, T.J. Wallington, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3316.
- [10] J.W. Martin, D.A. Ellis, S.A. Mabury, M.D. Hurley, T.J. Wallington, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 864.
- [11] J. D'Eon, M.D. Hurley, T.J. Wallington, S.A. Mabury, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 1862.
- [12] M. Shoeib, T. Harner, P. Vlahos, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7577.
- [13] H.P. Arp, K. Gross, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 6869.
- [14] X. Querol, A. Alastueya, C.R. Ruiza, B. Artinanob, H.C. Hanssonc, R.M. Harrison, E. Buringh, H.M. ten Brink, M. Lutz, P. Bruckmann, P. Straehl, J. Schneider, *Atmos. Environ.* 38 (2004) 6547.
- [15] W.E. Wilson, J.C. Chow, C. Claiborn, W. Fusheng, J. Engelbrecht, J.G. Watson, *Chemosphere* 49 (2002) 1009.
- [16] Council Directive 1999/30/EC of 22 April 1999, *Off. J. Eur. Commun.* L 163/41, 29.6.1999.
- [17] Directive 2004/107/EC of the European Parliament and of the Council, *Off. J. Eur. Union*, L 23/3, 26.1.2005.
- [18] A. Dreyer, R. Ebinghaus, *Atmos. Environ.* 43 (2009) 1527.
- [19] V. Yusà, O. Pardo, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 304.

- [20] C.M. Butt, U. Berger, R. Bossi, G.T. Tomy, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 2936.
- [21] EU, Commission of the European Communities 2002/657/EC, *Off. J. Eur. Commun.* L221 (2002) 8.
- [22] N. Yamashita, K. Kannan, S. Taniyasu, Y. Horii, T. Okazawa, G. Petrick, T. Gamo, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 5522.
- [23] C.R. Mallet, Z. Lu, J.R. Mazzeo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 49.
- [24] I. Ericson, M. Gómez, M. Nadal, B. van Bavel, G. Lindström, J.L. Domingo, *Environ. Int.* 33 (2007) 616.
- [25] C.R. Powley, S.W. George, M.H. Russell, R.A. Hoke, R.C. Buck, *Chemosphere* 70 (2008) 664.
- [26] P. de Voogt, M. Sáez, *TrAC* 25 (2006) 326.
- [27] L. Sanchez-Prado, C. Garcia-Jares, M. Llompарт, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2390.
- [28] J. Dean, *Extraction Methods for Environmental Analysis*, Wiley, NewYork, 1998.
- [29] L. Jassie, R. Revesz, T. Kierstad, E. Hasty, S. Matz, in: H.M. Kingston, S.J. Haswell (Eds.), *Microwave-enhanced Chemistry. Fundamentals, Samples Preparation and Applications*, ACS, Washington, DC, USA, 1997, p. 569.
- [30] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, C.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smellers, V.R. Beke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [31] W.M.A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli, *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 881.
- [32] B.K. Matuszewsky, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019.
- [33] C.R. Powley, S.W. George, T.W. Ryan, R.C. Buch, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6353.
- [34] J.L. Barber, U. Berger, C. Chaemfa, S. Huber, A. Jahnke, C. Temme, K.C. Jones, *J. Environ. Monit.* 9 (2007) 530.

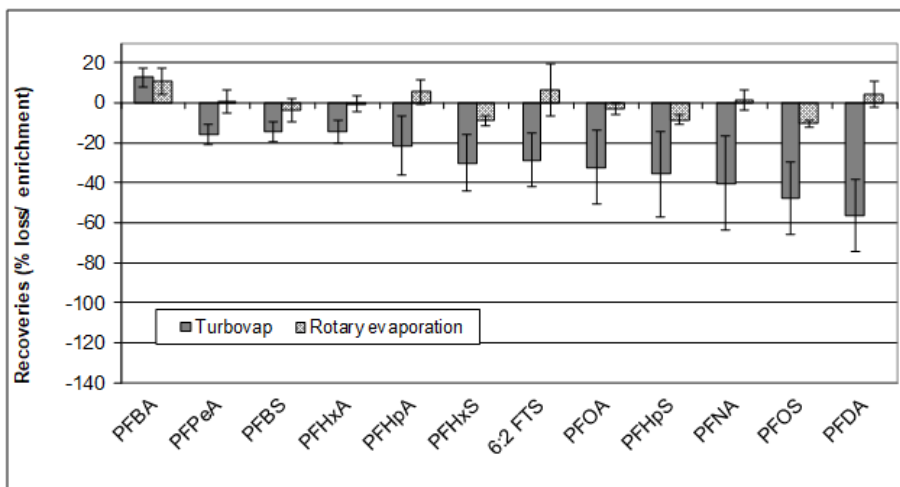
- [35] A. Jahnke, L. Ahrens, R. Ebinghaus, C. Temme, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 745.
- [36] U. Berger, M. Haukas, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 210.
- [37] A. Jahnke, J. Barber, K.C. Jones, C. Temme, *Atmos. Environ.* 43 (2009) 844.
- [38] B. Boulanger, A.M. Peck, J.L. Schnoor, K.C. Hornbuckle, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 74.
- [39] K. Harada, S. Nakanishi, K. Sasaki, K. Furuyama, S. Nakayama, N. Saito, K. Yamakawa, A. Koizumi, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76 (2006) 306.
- [40] A. Dreyer, V. Matthias, C. Temme, R. Ebinghaus, *Atmos. Environ.* 43 (2009) 4029. [41] S. Kim, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 8328.

**Appendix A. Supplementary Data**

*Section 1: Control of the evaporation step.*

During sample manipulation, care should be taken to avoid losses of ionic PFAS. Although ionic PFAS are not expected to volatilize, some losses were observed in the evaporation step. Significant losses in the amounts of 6:2 FTS and short chain PFCAs [1] have been reported when extracts were concentrated by evaporation to dryness. However, losses may be avoided by using a keeper solvent and by not blowing the extract down to dryness [2, 3].

In this study, diethylene glycol was used as keeper and extracts were evaporated at low temperature to prevent evaporative losses. Nevertheless, two different evaporation systems were tested: rotary evaporation (50 °C and 360 mbar) and a gentle stream of nitrogen carried out with Turbovap 500 (40 °C and 400 mbar). The loss of analytes during evaporation of the extract was estimated by measuring peak area counts for each analyte after 10 samples were spiked with the analytes before and after the evaporation step. Results obtained (as percentage) are shown in Fig. SC-1. Losses were observed in both procedures. The range of losses (mean values) were from 13% (PFBS) to -56% (PFDA) when a gentle stream of nitrogen was used and from 11% (PFBA) to -10% (PFOS) when using rotary evaporation. In view of the results obtained, rotary evaporation was selected as evaporation system in the PFAS determination.



**Figure SC-1:** Loss of PFAS during the evaporation step using a rotary evaporator at 50 °C and a gentle stream of nitrogen (Turbovap 500) at 40 °C. Error bars represent standard deviation (SD), n=4.

*References*

- [1] M. Shoeib, T. Harner, P. Vlahos, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 7577
- [2] Z.Kuklennyik, J.A. Reich, J.S. Tully, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3698.
- [3] M. Shoeib, T. Harner, M. Ikonomou, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 1313.

**Table SC-1a.** Responses in terms of area for several PFAS at different concentrations of ammonium acetate (2, 5, 10 mM) in mobile phase.

	<b>Response PFPeA (10<sup>7</sup>)</b>	<b>Response PFBS (10<sup>7</sup>)</b>	<b>Response PFDA (10<sup>7</sup>)</b>
<b>2 mM ammonium acetate</b>	2.3	0.5	1.2
<b>5 mM ammonium acetate</b>	2.6	0.6	1.4
<b>10 mM ammonium acetate</b>	2.3	0.4	1.1

Transitions: PFPeA (262.9>219.1), PFBS (298.9>80.0), PFDA (512.9>469.0).

**Table SC-1b.** Responses in terms of area for several PFAS at 5 mM ammonium acetate at different concentrations of acetic acid (0.1%, 0.2% and 0.3%).

	<b>Response PFPeA (10<sup>7</sup>)</b>	<b>Response PFBS (10<sup>7</sup>)</b>	<b>Response PFDA (10<sup>7</sup>)</b>
<b>0.1% acetic acid, 5 mM ammonium acetate</b>	1.8	0.4	0.9
<b>0.2% acetic acid, 5 mM ammonium acetate</b>	1.7	0.3	0.8
<b>0,3% acetic acid, 5 mM ammonium acetate</b>	1.6	0.2	0.6

Transitions: PFPeA (262.9>219.1), PFBS (298.9>80.0), PFDA (512.9>469.0).

*Section 2: DOE. Selection of factor settings*

The selection of the factor setting that simultaneously optimised the twelve PFAS responses was done using the “response optimiser” from response surface design in the MINITAB program. As we have multiple responses for each of the 12 compounds (Table SC-2), and as the response surfaces are different for each one, there is no factor setting that simultaneously maximizes the desirability for each dependent variable. It must be noticed that the desirability is 0.0 for the lowest values obtained in the CCD; increases as response increases, and is 1.0 for the highest response obtained in the experiments. For this reason, we maximize a composite desirability that combines the individual desirability of all the response variables into a single measure, taking into account that all the response variables have the same importance. The optimized factor settings were a time of 2 min, a temperature of 120 °C and a solvent volume of 25 mL. These conditions provide a composite desirability of 0.998, which means that with this factor setting practically all the compounds achieve maximum response.



**Table SC-2.** Experimental conditions of the Central Composite Design (CCD) used for the optimisation of MAE parameters and obtained responses (as peak area in arbitrary units) for PFAS.

Run	Temperature (°C)	Time (min)	Volume (mL)	Response PFBA (10 <sup>6</sup> )	Response PFPeA (10 <sup>6</sup> )	Response PFBS (10 <sup>6</sup> )	Response PFHxA (10 <sup>6</sup> )	Response PFHxS (10 <sup>6</sup> )	Response 6:2FTS (10 <sup>6</sup> )	Response PFHbS (10 <sup>6</sup> )	Response PFNA (10 <sup>6</sup> )	Response PFDA (10 <sup>6</sup> )
1	85	16	20	35.9	27.0	3.8	15.0	1.0	4.5	1.8	12.5	20.0
2	85	16	30	29.3	31.5	5.2	15.9	1.2	12.2	1.4	7.4	3.7
3	85	16	20	13.0	12.6	3.1	7.3	0.7	3.2	1.0	3.8	2.5
4	64	8	14	47.4	51.3	5.7	22.6	1.3	8.1	1.7	9.3	5.3
5	106	8	26	45.0	43.8	6.9	23.7	1.4	7.2	3.1	15.0	15.1
6	85	16	20	41.3	41.9	5.6	17.2	1.1	5.1	0.9	5.0	2.1
7	85	16	20	30.4	33.4	5.0	17.5	1.0	3.9	1.9	11.5	10.9
8	106	24	26	27.0	28.7	5.3	12.5	1.2	6.9	1.3	4.8	3.6
9	85	16	10	15.6	10.7	1.7	5.2	0.3	1.6	0.8	4.0	4.9
10	64	24	26	28.0	30.6	5.3	15.5	1.1	5.7	2.2	9.8	11.7
11	50	16	20	39.0	45.5	6.1	23.7	1.4	7.7	2.4	16.7	14.7
12	120	16	20	43.6	51.5	6.5	27.2	1.7	9.1	3.1	18.5	20.5
13	106	8	14	26.8	32.1	4.7	16.4	1.2	7.9	1.5	11.2	9.4
14	64	8	26	28.2	26.3	5.1	12.4	1.1	5.9	2.0	6.4	5.4
15	106	24	14	35.2	43.3	4.9	21.5	1.2	6.4	1.7	18.8	18.1
16	85	30	20	28.0	27.8	5.3	13.4	1.2	5.5	1.9	6.3	3.9
17	64	24	14	29.2	30.3	4.3	15.0	1.0	5.6	1.8	9.7	8.8
18	85	16	20	25.0	33.4	4.4	18.6	1.1	5.0	2.2	15.8	16.9
19	85	2	20	33.4	41.7	5.8	23.9	1.3	6.5	2.3	15.4	14.5
20	85	16	20	25.8	29.4	4.1	15.7	0.9	3.5	1.7	9.7	9.8

**Table SC-3.** Method detection limit (MDL) and complete regression data ( $y = a \cdot x + b$ ), including slope (a), intercept (b), standard deviation (SD) of the curves, coefficient of determination ( $R^2$ ) and residual values.

Analyte	MDL ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )	a $\pm$ SD	b $\pm$ SD	$R^2$	Residual values (%)
<b>PFBA</b>	0.3	1.036 $\pm$ 0.011	0.013 $\pm$ 0.013	0.9996	8
<b>PFPeA</b>	0.2	1.072 $\pm$ 0.014	-0.011 $\pm$ 0.018	0.9993	6
<b>PFBS</b>	0.1	0.2856 $\pm$ 0.006	-0.001 $\pm$ 0.007	0.9982	11
<b>PFHxA</b>	0.3	0.883 $\pm$ 0.010	-0.016 $\pm$ 0.012	0.9995	8
<b>PFHpA</b>	0.2	0.907 $\pm$ 0.005	-0.009 $\pm$ 0.007	0.9999	6
<b>PFHxS</b>	0.2	0.030 $\pm$ 0.001	-0.001 $\pm$ 0.001	0.9976	12
<b>PFHpS</b>	0.1	0.264 $\pm$ 0.007	-0.003 $\pm$ 0.009	0.9972	11
<b>6:2FTS</b>	0.03	151517 $\pm$ 2970	-24073 $\pm$ 72318	0.9984	10
<b>PFOA</b>	0.1	1097401 $\pm$ 16317	1202086 $\pm$ 397229	0.9991	11
<b>PFNA</b>	0.1	1.046 $\pm$ 0.008	0.006 $\pm$ 0.009	0.9998	7
<b>PFOS</b>	0.1	1.596 $\pm$ 0.024	-0.043 $\pm$ 0.029	0.9991	15
<b>PFDA</b>	0.2	16.291 $\pm$ 0.174	-0.516 $\pm$ 0.212	0.9995	6

**Table SC – 4.** Concentrations of PM2.5-bound PFAS (pg m<sup>-3</sup>) in Elche - P.B station in Province of Alicante (Spain).

<b>Elche-P.B</b>											
	<b>S1</b>	<b>S2</b>	<b>S3</b>	<b>S4</b>	<b>S5</b>	<b>S6</b>	<b>S7</b>	<b>S8</b>	<b>S9</b>	<b>S10</b>	<b>S11</b>
<b>PFBA</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.3	n.d	n.d
<b>PFPeA</b>	1.8	d	d	d	d	d	n.d	1.6	1.7	n.d	d
<b>PFBS</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>PFHxA</b>	d	d	n.d	d	d	d	d	d	d	d	<d
<b>PFHpA</b>	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
<b>PFHxS</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	d	d
<b>6:2FTS</b>	1.7	3.7	6.7	34.3	34.1	33.8	23.2	34.2	d	d	d
<b>PFOA</b>	d	d	d	d	d	d	d	1.5	d	d	1.7
<b>PFHpS</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>PFNA</b>	3.1	3.4	2.1	d	d	d	d	1.8	2.7	3	d
<b>PFOS</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	d	4.4	n.d
<b>PFDA</b>	1.7	d	d	d	d	d	d	d	d	7.6	n.d
<b>ΣPFCS</b>	8.3	7.1	8.8	34.3	34.1	33.8	23.2	39.1	6.7	15.0	1.7

S=sample; n.d: not detected; d: detected

**Table SC – 5.** Concentrations of PM2.5-bound PFAS (pg m<sup>-3</sup>) in Elche - P.A station in Province of Alicante (Spain).

<b>Elche-P.A.</b>													
	<b>S12</b>	<b>S13</b>	<b>S14</b>	<b>S15</b>	<b>S16</b>	<b>S17</b>	<b>S18</b>	<b>S19</b>	<b>S20</b>	<b>S21</b>	<b>S22</b>	<b>S23</b>	<b>S24</b>
<b>PFBA</b>	n.d	d	d	d	d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>PFPeA</b>	d	n.d	1.8	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	d	n.d
<b>PFBS</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>PFHxA</b>	d	d	d	d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	d	n.d	d	d
<b>PFHpA</b>	d	d	d	d	d	d	n.d	d	n.d	n.d	n.d	d	d
<b>PFHxS</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	d	n.d	n.d	d	n.d	15.9	n.d	d	n.d
<b>6:2FTS</b>	5.7	3.4	2.8	2.4	d	d	d	d	d	n.d	d	d	D
<b>PFOA</b>	d	d	d	n.d	n.d	3.9	6.6	13.8	3.9	3	13.3	1.8	2.2
<b>PFHpS</b>	d	n.d	d	n.d	n.d	n.d	d	d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>PFNA</b>	1.5	2.1	d	2.6	3.4	5.5	d	d	11.8	3.9	D	1.5	1.5
<b>PFOS</b>	d	n.d	d	d	d	d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	d
<b>PFDA</b>	d	d	d	2.5	d	1.6	2.3	2.6	d	d	d	n.d	1.4
<b>ΣPFCS</b>	7.2	5.5	4.6	7.5	3.4	11.0	8.9	16.4	15.7	6.9	13.3	3.3	5.1

S= sample; n.d: not detected; d: detected

**Table SC – 6.** Concentrations of PM2.5-bound PFAS (pg m<sup>-3</sup>) in Alicante - El Pla station in Province of Alicante (Spain).

<b>Alicante-El Pla</b>											
	<b>S25</b>	<b>S26</b>	<b>S27</b>	<b>S28</b>	<b>S29</b>	<b>S30</b>	<b>S31</b>	<b>S32</b>	<b>S33</b>	<b>S34</b>	<b>S35</b>
<b>PFBA</b>	n.d	n.d	n.d	d	d	n.d	d	d	d	n.d	n.d
<b>PFPeA</b>	d	d	d	d	n.d	d	1.4	d	d	d	d
<b>PFBS</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>PFHxA</b>	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
<b>PFHpA</b>	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d	d
<b>PFHxS</b>	d	d	d	n.d	d	n.d	d	n.d	d	d	d
<b>6:2FTS</b>	5.1	1.6	2.3	d	2.7	1.4	2	d	2.8	8.9	1.4
<b>PFOA</b>	1.5	d	d	2	1.4	2	1.9	d	2.9	2.1	1.4
<b>PFHpS</b>	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	d	n.d	n.d	n.d
<b>PFNA</b>	d	d	1.9	d	d	d	1.6	1.8	1.4	d	d
<b>PFOS</b>	d	d	d	n.d	d	d	d	d	d	d	n.d
<b>PFDA</b>	1.9	d	2.1	1.9	d	d	d	1.7	1.8	2.3	2.1
<b>ΣPFCS</b>	8.5	1.6	6.3	3.9	4.1	3.4	6.9	3.5	8.9	13.3	4.9

S= sample; n.d: not detected: d: detected

**Table SC – 7.** Concentrations of PM2.5-bound PFAS (pg m<sup>-3</sup>) in Alicante - Pinoso station in Province of Alicante (Spain).

<b>Alicante - Pinoso</b>			
	<b>S36</b>	<b>S37</b>	<b>S38</b>
<b>PFBA</b>	n.d	n.d	n.d
<b>PFPeA</b>	d	n.d	d
<b>PFBS</b>	n.d	n.d	n.d
<b>PFHxA</b>	d	d	d
<b>PFHpA</b>	d	d	d
<b>PFHxS</b>	n.d	n.d	n.d
<b>6:2FTS</b>	d	d	1.4
<b>PFOA</b>	1.4	d	1.6
<b>PFHpS</b>	n.d	n.d	n.d
<b>PFNA</b>	1.9	d	1.4
<b>PFOS</b>	n.d	d	n.d
<b>PFDA</b>	n.d	1.4	1.6
<b>ΣPFCS</b>	3.3	1.4	6.0

S= sample; n.d: not detected: d: detected

**Table SC – 8.** Concentrations of PM<sub>2.5</sub>-bound PFAS (pg m<sup>-3</sup>) in Alcoy station in Province of Alicante (Spain).

<b>Alicante - Alcoy</b>			
	<b>S39</b>	<b>S40</b>	<b>S41</b>
<b>PFBA</b>	n.d	n.d	n.d
<b>PFPeA</b>	n.d	d	d
<b>PFBS</b>	n.d	n.d	n.d
<b>PFHxA</b>	d	d	d
<b>PFHpA</b>	d	d	d
<b>PFHxS</b>	1.5	n.d	n.d
<b>6:2FTS</b>	2.2	1.8	6.4
<b>PFOA</b>	4.4	d	2.1
<b>PFHpS</b>	n.d	n.d	n.d
<b>PFNA</b>	2.3	2.5	1.8
<b>PFOS</b>	d	n.d	d
<b>PFDA</b>	3.5	11	2.2
<b>ΣPFCS</b>	13.9	15.3	12.5

S= sample; n.d: not detected: d: detected

**Table SC-9.** Estimated concentration (pg m<sup>-3</sup>) of four field blanks (one with each set of samples extracted).

<b>Field blank samples</b>				
	<b>B1</b>	<b>B2</b>	<b>B3</b>	<b>B4</b>
<b>PFBA</b>	0.3	n.d	0.3	n.d
<b>PFPeA</b>	0.3	0.2	0.2	0.3
<b>PFBS</b>	n.d	n.d	0.1	n.d
<b>PFHxA</b>	n.d	n.d	0.3	0.3
<b>PFHpA</b>	n.d	n.d	n.d	0.4
<b>PFHxS</b>	n.d	n.d	n.d	n.d
<b>6:2FTS</b>	0.04	0.05	0.03	0.04
<b>PFOA</b>	0.2	0.3	0.1	0.2
<b>PFHpS</b>	0.2	n.d	n.d	n.d
<b>PFNA</b>	0.3	0.3	0.1	0.2
<b>PFOS</b>	0.1	n.d	0.2	n.d
<b>PFDA</b>	0.3	n.d	0.2	0.2

Concentrations <1.4 pg m<sup>-3</sup> were outside or the working calibration curve n.d: not detected.



## 3. ARTÍCULO CIENTÍFICO 2

Journal of Chromatography A, 1323 (2014) 1–10



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)

## Design of experiment approach for the optimization of polybrominated diphenyl ethers determination in fine airborne particulate matter by microwave-assisted extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry

Maria Isabel Beser<sup>a</sup>, Joaquim Beltrán<sup>b</sup>, Vicent Yusà<sup>a, c, \*</sup><sup>a</sup> Public Health Laboratory of Valencia – FISABIO, Av. Catalunya, 21, 46020 Valencia, Spain<sup>b</sup> Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Avda Sos Baynat s/n, 12071 Castellón, Spain<sup>c</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Doctor Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 31 July 2013

Received in revised form 24 October 2013

Accepted 25 October 2013

Available online 26 November 2013

## Keywords:

PBDEs

PM2.5

Programmed temperature vaporizer (PTV)

Microwave assisted extraction (MAE)

GC-MS/MS

Experimental design

## ABSTRACT

A sensitive and selective procedure for the determination of 12 polybrominated diphenyl ethers (BDE-28, BDE-49, BDE-47, BDE-66, BDE-100, BDE-119, BDE-99, BDE-155, BDE-154, BDE-153, BDE-139 and BDE-183) in airborne particulate matter (PM2.5) at trace level has been developed. The proposed method includes extraction PM2.5-bound PBDEs by microwave-assisted extraction (MAE) followed by gel permeation chromatography (GPC) clean-up and determination by GC-MS/MS using a programmed temperature vaporizer (PTV) in large volume injection (LVI) mode to introduce the sample to the chromatographic system. A design of experiment (DoE) approach was used for the optimization of large volume injection and microwave-assisted extraction parameters to improve these techniques efficiency. Other conditions of the method were studied: GC-MS/MS parameters, extraction solvent and matrix effect. The limit of quantification ranged from 0.063  $\text{pg m}^{-3}$  to 0.210  $\text{pg m}^{-3}$  when air volumes of 723  $\text{m}^3$  were collected. Recoveries ranged from 80% to 106%. The method was successfully applied to eight real samples collected from a residential area of the monitoring network of the Region of Valencia Government (Spain) during April–August 2012. BDE-47 and BDE-99 were quantified in six and five samples respectively. The concentrations were ranged from 0.063 to 0.112  $\text{pg m}^{-3}$  for BDE-47, and from 0.107 to 0.212  $\text{pg m}^{-3}$  for BDE-99.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) belong to the group of brominated flame retardants and are widely used as additives to a great variety of consumer products, such as textiles, automobile accessories, computers and other materials to prevent or retard the spread of fire. PBDEs are mixed and not chemically bonded with products, so they can be easily released into the environment by volatilization or dust formation during the use of treated products [1–3]. This fact, together with their lipophilic properties and their potential for long-range environmental transport, contributes to the presence and bioaccumulation of PBDEs in the environment, and to become a persistent source of emission of these compounds [4,5].

The environmental fate of different congeners depends to a large extent on their physical and chemical properties, such as partitioning coefficients and vapor pressures. PBDEs can be present in atmosphere in both the gas and particulate phase in different proportion. The greater the vapor pressure, and the lower the octanol air partition coefficient, the more likely the BDE congener will volatilize from the product into the air. Lower-brominated PBDEs primarily exist in the vapor phase, while higher-brominated congeners are primarily adsorbed to atmospheric particles. Thus, more than 98% of the mono-, di-, tri-BDE congeners may be present in the vapor phase in ambient air. The various tetra- and penta-BDE congeners begin to distribute more to atmospheric particles than the lesser brominated compounds. The hexa- and hepta-congeners may be present in the particle phase from 87 to 99% at an ambient air temperature of 25 °C. Additionally, higher brominated BDEs (like hepta- to deca-BDEs) can be degraded by ultraviolet light to form lower-brominated BDEs. This fact can result in the continued presence of lower-brominated congeners in the environment [6].

The atmosphere is considered an important mobile phase for the long-range transport of PBDEs toward remote regions far away

\* Corresponding author at: Public Health Laboratory of Valencia – FISABIO, Av. Catalunya, 21, 46020 Valencia, Spain. Tel.: +34 961925865; fax: +34 961925888. E-mail address: [yusa.vic@gva.es](mailto:yusa.vic@gva.es) (V. Yusà).





*Journal of Chromatography A, 1323 (2014) 1-10*

**Design of experiment approach for the optimization of polybrominated diphenyl ethers determination in fine airborne particulate matter by microwave-assisted extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry**

Maria Isabel Beser<sup>a</sup>, Joaquim Beltrán<sup>b</sup>, Vicent Yusà<sup>a,c\*</sup>

<sup>a</sup> Public Health Laboratory of Valencia-FISABIO, Av. Catalunya, 21, 46020 Valencia, Spain

<sup>b</sup> Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

<sup>c</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Doctor Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

---

**ABSTRACT**

A sensitive and selective procedure for the determination of 12 polybrominated diphenyl ethers (BDE-28, BDE-49, BDE-47, BDE-66, BDE-100, BDE-119, BDE-99, BDE-155, BDE-154, BDE-153, BDE-139 and BDE-183) in airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) at trace level has been developed. The proposed method includes extraction PM<sub>2.5</sub>-bound PBDEs by microwave-assisted extraction (MAE) followed by gel permeation chromatography (GPC) clean-up and determination by GC-MS/MS using a programmed temperature vaporizer (PTV) in large volume injection (LVI) mode to introduce the sample to the chromatographic system. A design of experiment (DoE) approach was used for the optimization of large volume injection and microwave-assisted extraction parameters to improve these techniques efficiency. Other conditions of the method were studied: GC-MS/MS parameters, extraction solvent and matrix effect. The limit of quantification ranged from 0.063 pg m<sup>-3</sup> to 0.210 pg m<sup>-3</sup> when air volumes of 723 m<sup>3</sup> were collected. Recoveries ranged from 80% to 106%. The method was successfully applied to eight real samples collected from a residential area of the monitoring network of the Region of Valencia Government (Spain) during April–August 2012. BDE-47 and BDE-99 were quantified in six and five samples respectively. The concentrations were ranged from 0.063 to 0.112 pg m<sup>-3</sup> for BDE-47, and from 0.107 to 0.212 pg m<sup>-3</sup> for BDE-99.

**Keywords:** PBDEs, PM<sub>2.5</sub>, Programme temperature vaporizer (PTV), Microwave assisted extraction (MAE), GC-MS/MS, Experimental design.

## 1. Introduction

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) belong to the group of brominated flame retardants and are widely used as additives to a great variety of consumer products, such as textiles, automobile accessories, computers and other materials to prevent or retard the spread of fire. PBDEs are mixed and not chemically bonded with products, so they can be easily released into the environment by volatilization or dust formation during the use of treated products [1–3]. This fact, together with their lipophilic properties and their potential for long-range environmental transport, contributes to the presence and bioaccumulation of PBDEs in the environment, and to become a persistent source of emission of these compounds [4,5].

The environmental fate of different congeners depends to a large extent on their physical and chemical properties, such as partitioning coefficients and vapor pressures. PBDEs can be present in atmosphere in both the gas and particulate phase in different proportion. The greater the vapor pressure, and the lower the octanol air partition coefficient, the more likely the BDE congener will volatilize from the product into the air. Lower-brominated PBDEs primarily exist in the vapor phase, while higher-brominated congeners are primarily adsorbed to atmospheric particles. Thus, more than 98% of the mono-, di-, tri-BDE congeners may be present in the vapor phase in ambient air. The various tetra- and penta-BDE congeners begin to distribute more to atmospheric particles than the lesser brominated compounds. The hexa- and hepta-congeners may be present in the particle phase from 87 to 99% at an ambient air temperature of 25 °C. Additionally, higher brominated BDEs (like hepta- to deca-BDEs) can be degraded by ultraviolet light to form lower-brominated BDEs. This fact can result in the continued presence of lower-brominated congeners in the environment [6].

The atmosphere is considered an important mobile phase for the long-range transport of PBDEs toward remote regions far away from source areas. Vapor phase mono-, di-, and tri-brominated compounds have the highest tendency for long-range transport in the atmosphere because they are unsusceptible to particle surface deposition. The tetra- and penta-brominated congeners are partitioned more equally between vapor and particle phases and they have

characteristic travel distances that are somewhat less than the vapor phase compounds [6,7].

Atmospheric particulate matter (PM) is made up of a mixture of solid and aqueous species which enter the atmosphere by anthropogenic and natural pathways and present a range of morphological, physical and chemical properties in different areas [8]. The organic fraction is especially complex and contains hundreds of organic compounds [9]. The selection of PM<sub>10</sub> and PM<sub>2.5</sub> (fraction of particulate matter with aerodynamic diameter range smaller than 10 and 2.5 µm respectively) rather than total suspended particulate matter as indicators of air pollution, is based on health considerations since the fine fraction of PM is the most dangerous for human health. Likewise, the comparability among studies is improved if PM<sub>10</sub> or PM<sub>2.5</sub> is used instead of bulk samplers. The regulatory concern is today focused on those particles small enough to enter the thoracic region (respirable fraction) [10,11].

The extraction technique most widely used to extract PBDEs from airborne particulate matter is Soxhlet extraction with solvent mixtures such as hexane:acetone (1:1) or dichloromethane:hexane (1:1) [1,12-14]. Some of the main drawbacks of this technique are the high consumption of solvents and the long extraction time, which generally exceeds 8 h. Other authors have carried out the extraction by sonication or by pressurized liquid extraction (PLE) with different extraction solvents such as dichloromethane:hexane (1:1) [1], hexane:acetone (1:1) [15-17], or dichlorometane [18]. Microwave assisted extraction (MAE) has also been used with hexane:acetone (1:1) as an extraction solvent [19]. It is well known that MAE, like PLE, allows the reduction of extraction time and organic solvent consumption, and increases sample throughput in the extraction of different pollutants from environmental matrices [20].

Regarding determination, gas chromatography coupled to single analyzer mass spectrometry (GC-MS) (typically operated in electron capture negative ionization or electron ionization (EI) mode) remains the most widely used analytical technique for measuring PBDEs in airborne particulate matter [1,12-17,19,21,22]. The GC-MS analysis of PBDEs in environmental samples is not easy to achieve due to the number of co-extracted compounds, which adversely affect the method efficiency and instrument performance. Gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) using ion trap or triple

quadrupole (QqQ) analyzers minimizes or removes interferences and reduces chemical noise in chromatograms thus improving both selectivity and sensitivity. Some studies for determination of PBDEs in biological and environmental samples have been published [1,5,23]. However, to our knowledge, no works for determination of PBDEs in airborne particulate matter using GC-MS/MS have been published yet. Use of liquid chromatography with negative ion atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry has also been reported by certain researchers [24].

The injection technique most commonly used in gas chromatography is splitless injection. Nevertheless, it is recommended to use an injector with programmed thermal vaporization (PTV) in order to avoid degradation of higher BDE congeners [23]. Moreover, the injection of large volumes (10–100  $\mu\text{L}$ ) in the PTV (PTV-LVI) enables significant improvement of overall sensitivity of the analytical method [25]. When attempting to discover the most relevant variable and then optimize a response by tuning these factors, experimental design (design of experiments, DoE) gives a powerful suite of statistical methodology [26].

In this work we have developed and validated a sensitive and selective method for the determination of 12 PBDEs in fine airborne particulate matter (PM<sub>2.5</sub>). A design of experiments multivariate approach has been used to optimize the most important parameters of PTV injection and MAE extraction. The procedure has been completed with gel permeation chromatography (GPC) clean-up and determination by gas chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. The method was applied to several real samples of PM<sub>2.5</sub> filters collected from the monitoring network of the Regional Valencia Government (Spain).

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and chemicals

Standards of PBDEs (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  in isooctane) were purchased from AccuStandard (NewHaven, USA) with purity higher than 97%: BDE-28 (2,4,4'-Tribromodiphenyl ether), BDE-47 (2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether), BDE-49 (2,2',4,5'-Tetrabromodiphenyl ether), BDE-66 (2,3',4,4'-Tetrabromodiphenyl ether), BDE-99 (2,2',4,4',5-Pentabromodiphenyl ether), BDE-100 (2,2',4,4',6-Pentabromodiphenyl ether), BDE-119 (2,3',4,4',6-Pentabromodiphenyl ether), BDE-139 (2,2',3,4,4',6-Hexabromodiphenyl ether), BDE-153 (2,2',4,4',5,5'-

Hexabromodiphenyl ether), BDE-154 (2,2',4,4',5,6-Hexabromodiphenyl ether), BDE-155 (2,2',4,4',6,6'-Hexabromodiphenyl ether), BDE-183 (2,2',3,4,4',5',6-Heptabromodiphenyl ether). Stock standard solutions ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) were prepared by dilution of PBDEs standards in n-hexane.

Two working solutions of 12 PBDEs, W1 ( $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ) and W2 ( $2 \text{ ng mL}^{-1}$ ), used for sample fortification and matrix-matched calibration, were obtained by volume diluting stock standard solutions with n-hexane, using a maximum dilution factor of 10 in every dilution step.

Isotopically labeled internal standards (ILIS) used for the analysis of PBDEs were purchased from AccuStandard (NewHaven, USA): MBDE-28 (2,4,4'-Tribromo[ $^{13}\text{C}_{12}$ ]diphenyl ether), MBDE-47 (2,2',4,4'-Tetrabromo[ $^{13}\text{C}_{12}$ ]diphenyl ether), MBDE-99 (2,2',4,4',5- Pentabromo[ $^{13}\text{C}_{12}$ ]diphenyl ether) and MBDE-153 (2,2',4,4',5,5'- Hexabromo[ $^{13}\text{C}_{12}$ ]diphenyl ether) at a concentration of  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  in isooctane. Stock internal standard solutions were prepared by dilution of ILIS standards in n-hexane. An internal standard solution (IS solution,  $100 \text{ ng mL}^{-1}$ ) was prepared by volume diluting the stock internal standard solutions with n-hexane.

Acetone for gas chromatography (SupraSolv®) was supplied by Merk (Darmstadt, Germany). Dichloromethane stabilized with  $\sim 20$  ppm of amilene and n-hexane (both for residue analysis grade) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain).

Statistical data manipulation and numerical analysis of data resulting from experimental design were carried out by means of the statistical package MINITAB for Windows, Release 14 (Minitab Inc., Birmingham, UK).

## 2.2. Sampling and site characterization

PM<sub>2.5</sub> samples were collected using a large-volume active sampler from Digital (Madrid, Spain) equipped with a PM<sub>2.5</sub> size-selective inlet head (cyclone). Quartz fiber filters of 150 mm of diameter were supplied by Munktell filter AB (Falun, Sweden). A sampling flow of  $30 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  and a sampling time of 24 h were used providing a total volume of filtered air of around  $720 \text{ m}^3$ . These conditions and the performance requirements of the sampler instrument are given in the European Standard EN14907:2005 and EN12341:1999 [27,28].

The samples (filters) were stored at -20 °C approximately until analysis in order to prevent changes in the sample composition or in the PBDEs concentrations.

Air samples were collected in Elche, a town located in the south of Alicante province (Spain). The sampling station was situated in a residential area (a fire station, 0°43'03"W, 38°15'33"N). Eight samples were collected from April to August 2012.

To perform the PM<sub>2.5</sub> determination, a micro-balance MX5 from Mettler-Toledo (Bedford, MA, USA) was used. Filters were previously conditioned according to EN 12341:1999 standard, at temperature (20 ± 1 °C) and at relative humidity (50 ± 5 %RH) conditions for at least 48 h, and then weighed. Prior to weighing, filters were baked during 24 h at 300 °C to eliminate organics.

### 2.3. Gas chromatography-mass spectrometry determination

A Trace GC Ultra equipped with a Triplus autosampler was coupled to a triple quadrupole (QqQ) mass spectrometer, all from Thermo-Finningan (TSQ Quantum GC, San José, CA, USA). Separation was carried out on a HP-5MS capillary column from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) 30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film. High-purity helium (99.9999%) and argon (99.9999%) were employed as carrier gas (constant flow of 1.5 mL min<sup>-1</sup>) and as collision gas, respectively, both from Air Liquide (Madrid, Spain).

The oven temperature program was as follows: initial 80 °C (2 min); 25 °C min<sup>-1</sup> to 230 °C; 5 °C min<sup>-1</sup> to 320 °C (5 min). Injections were accomplished using a PTV injector (BEST PTV, Thermo-Finningan, TSQ Quantum GC, San José, CA, USA) under the following conditions: injection volume, 20 µL; split flow, 10 mL min<sup>-1</sup>; splitless time, 2 min; The temperature program of the PTV was: 50 °C; 14.5 °C s<sup>-1</sup> to 80 °C (2 min); 13 °C s<sup>-1</sup> to 350 °C (6 min). The split valve program was 2 min open (solvent elimination); closed (2 min, analytes transfer) and open until end of the run. The injector flow program was 10 mL min<sup>-1</sup> (2 min) (solvent elimination); 1.5 mL min<sup>-1</sup> (140 s; analytes transfer); 300 mL min<sup>-1</sup> (4 min; cleaning step); 10 mL min<sup>-1</sup>.

The mass spectrometer was operated in the electron ionization mode (EI) using an energy of 70 eV and a filament current of 50 µA. The ion source temperature and the transfer line temperature were set to 250 °C and 300 °C respectively. Selected reaction monitoring mode (SRM) was used for all analytes. **Table 1**

shows the three monitored transitions for each PBDE, the most intense ones (in bold) for quantification and the other ones for confirmation.

Data acquisition and processing were performed using the QuanLab software (Thermo, San José, CA, USA) data process system.

#### **2.4. MAE extraction**

PBDEs were extracted from PM<sub>2.5</sub> filters using a microwave assisted extraction system, a Mars system from CEM Corporation (Mathews, NC, USA), equipped with Teflon® TFM 100 mL extraction vessels. The method was as follows: filter was extracted with 50 mL of n-hexane:acetone (1:1, v/v) at 75 °C for 2 min, using a power of 600 W. After cooling, the extractor was opened and the extracts were filtered by gravity using a paper filter. The extracts were evaporated to dryness at 40 °C with a Turbo Vap 500 (Zymark, Idstein, Germany) and re-dissolved with 710 µL of dichloromethane before the injection in the GPC clean-up.

#### **2.5. Gel permeation chromatography clean-up**

The Waters Gel permeation Chromatography Clean Up System was employed, integrated by a Waters 515 high-pressure liquid chromatography pump, a Waters 717 sample input module, tandem columns Envirogel GPC clean up 19 mm × 150 mm and 19 mm × 300 mm, and a Waters 2487 UV detector (254 nm), together with a Gilson FC 204 Fraction Collector.

Before each sample batch, the GPC was calibrated with a calibration solution which consisted of corn oil, bis(2-ethylhexyl)phthalate, methoxychlor, perylene [29]. The calibration chromatograms were examined to ensure that the relative retention times and peak shapes were as expected.

Optimization of this step was carried out by injecting in the GPC system a concentrated standard solution of 12 PBDEs and collecting different time window fractions to analyze. When injecting 700 µL of sample and eluting with methylene chloride at 5 mL min<sup>-1</sup>, the fraction containing the PBDEs (quantitative recovery) was between 14 and 22 min. The collected fractions were evaporated to dryness under a nitrogen flow at 40 °C, and re-dissolved with 150 µL of hexane prior to the GC-MS/MS determination.

## 2.6. Validation and quality control protocol

The validation of the method for the 12 selected PBDEs was carried out using spiked PM<sub>2.5</sub> field blank samples. The field blank consists on a filter exposed for 24 h and subsequently baked for 24 h at 300 °C to remove any possible presence of PBDEs. Field blank samples were spiked with the standards, solution W2 (2 ng mL<sup>-1</sup>) or solution W1 (10 ng mL<sup>-1</sup>) for LoQ or the highest level of the working range, respectively; and kept overnight to ensure interaction between the matrix and the analytes. The following parameters were studied in order to ensure the method quality: linearity, accuracy (measured as mean recovery), precision (expressed as repeatability), specificity and limits of quantification (LoQ).

Linearity of the method was evaluated taking five point calibration matrix-matched standards using relative areas calculated with the corresponding internal standards (**Table 1**), in triplicate, in the range of 0.3–10 ng mL<sup>-1</sup> in vial. Accuracy and precision were determined by analyzing spiked field blank samples at two different concentrations, at limit of quantification level (0.063 pg m<sup>-3</sup> for BDE-28, BDE-49, BDE-47, BDE-66 and BDE-100, 0.105 pg m<sup>-3</sup> for BDE-119 and BDE-99, and 0.210 pg m<sup>-3</sup> for BDE-155, BDE-154, BDE-153, BDE-139 and BDE-183) and at the highest level of the calibration curve (2.104 pg m<sup>-3</sup>). The analytical schedule was three days and three replicates each day.

The limit of quantification (LoQ) was established as the lowest concentration tested in which recovery and precision were satisfactory (80–120% and <20% RSD, respectively) (0.063 pg m<sup>-3</sup> for BDE-28, BDE-49, BDE-47, BDE-66 and BDE-100; 0.105 pg m<sup>-3</sup> for BDE-119 and BDE-99; and 0.210 pg m<sup>-3</sup> for BDE-155, BDE-154, BDE-153, BDE-139 and BDE-183).

For a positive identification (confirmation criteria) in accordance with the EU guidelines [30], the following rules have been applied: (i) two transitions per compound must be monitored, in our study three transitions are monitored (one for quantification and two for confirmation), (ii) the GC retention time of the analyte in the sample must be within 0.5% of retention time in the standard, (iii) the relative abundance of the SRM transitions signals must be within 20–50% of the ratio obtained for the standards, and (iv) the S/N of the diagnostic transitions must be >3.



Each set of filters was analyzed under quality assurance protocols, including process blanks, spiked blanks and reagent blanks. A process blank, a reagent blank, and six spiked blanks (three at LoQ level and the other three at the highest level of the working range) were analyzed in each validation batch.

**Table 1**

GC-MS/MS experimental parameters for studied PBDEs.

<b>PBDE number</b>	<b>Retention time (min)</b>	<b>Precursor ion (m/z)</b>	<b>m/z loss</b>	<b>Product ion (m/z)</b>	<b>Collision Energy (V)</b>	<b>Scan time (min)</b>
28 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	11.02	<b>258.20 [M-Br<sub>2</sub>]<sup>+</sup></b>	<b>[COBr]</b>	<b>150.10</b>	24	0.020
		417.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	257.96	15	
		419.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	259.96	15	
28 <sup>(1)</sup>	11.02	<b>246.10 [M-Br<sub>2</sub>]<sup>+</sup></b>	<b>[COBr]</b>	<b>139.00</b>	24	0.020
		405.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	245.96	15	
		407.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	247.96	15	
49 <sup>(2)</sup>	12.86	<b>485.71 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>325.88</b>	15	0.020
		326.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	217.10	24	
		483.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	323.90	15	
47 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	13.29	<b>497.80 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>337.90</b>	15	0.020
		338.00 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	230.10	24	
		495.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	335.90	15	
47 <sup>(2)</sup>	13.30	<b>485.71 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>325.88</b>	15	0.020
		326.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	217.10	24	
		483.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	323.90	15	
66 <sup>(2)</sup>	13.65	<b>485.71 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>325.88</b>	15	0.020
		326.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	217.10	24	
		483.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	323.90	15	
100 <sup>(3)</sup>	15.40	<b>563.20 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>403.79</b>	18	0.020
		565.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	405.80	18	
		406.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	297.00	29	
119 <sup>(3)</sup>	15.63	<b>563.20 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>403.79</b>	18	0.020
		565.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	405.80	18	
		406.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	297.00	29	
99 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	16.01	<b>575.80 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>415.80</b>	18	0.020
		577.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	417.80	18	
		418.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	308.10	29	
99 <sup>(3)</sup>	16.02	<b>563.20 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>403.79</b>	18	0.020
		565.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	405.80	18	
		406.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	297.00	29	
155 <sup>(4)</sup>	17.51	<b>643.53 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>483.70</b>	18	0.020
		641.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	481.80	18	

		484.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	377.00	25	
154 <sup>(4)</sup>	17.96	<b>643.53 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>483.70</b>	18	0.020
		641.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	481.80	18	
		484.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	377.00	25	
153 <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	18.92	<b>655.80 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>495.80</b>	25	0.020
		653.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	493.80	25	
		496.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	386.10	25	
153 <sup>(4)</sup>	18.93	<b>643.53 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>483.70</b>	18	0.020
		641.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	481.80	18	
		484.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	377.00	25	
139 <sup>(4)</sup>	19.38	<b>643.53 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>483.70</b>	18	0.020
		641.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	481.80	18	
		484.10 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	377.00	25	
183 <sup>(4)</sup>	21.98	<b>721.44 [M]<sup>+</sup></b>	<b>[Br<sub>2</sub>]</b>	<b>561.60</b>	18	0.020
		723.80 [M] <sup>+</sup>	[Br <sub>2</sub> ]	563.80	18	
		562.00 [M-Br <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	[COBr]	402.00	34	

<sup>(1)</sup> 28<sup>13</sup>C<sub>12</sub> was used as internal standard for this compound.

<sup>(2)</sup> 47<sup>13</sup>C<sub>12</sub> was used as internal standard for these compounds.

<sup>(3)</sup> 99<sup>13</sup>C<sub>12</sub> was used as internal standard for these compounds.

<sup>(4)</sup> 153<sup>13</sup>C<sub>12</sub> was used as internal standard for these compounds.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. GC-MS/MS conditions

##### 3.1.1. MS/MS optimization

The use of QqQ analyzer in SRM mode is one of the most selective and sensitive approaches for trace analysis in environmental pollutants. However, it is necessary to optimize the MS/MS parameters to raise the maximum signal for each PBDE.

The full scan mass spectrum for each BDE congener was obtained and examined to determine the most abundant or selective ions that could be used as precursor ions for MS/MS analysis. This was carried out by injecting a standard solution of 500 ng mL<sup>-1</sup> in n-hexane.

Once selected the precursor ions, a product ion scan was performed applying an energy ramp between 5 and 30 eV in order to find the most selective and sensitive product ions. Finally, collision energy was fully optimized for the selected transitions for each BDE congener. Optimal values of collision energy

were found to be around 15 – 24 eV for low-brominated congeners and increased to around 18 – 34 eV for high-brominated congeners.

The most sensitive transitions were selected for quantification and the secondary transitions were used for confirmatory purposes. The quantification transition for each BDE congener corresponded to the loss of  $[\text{Br}_2]$  from the precursor ion  $[\text{M}]^+$ , except for BDE-28, in which the quantification transition was the loss of  $[\text{COBr}]$  from the precursor ion  $[\text{M}-\text{Br}_2]^+$ . Confirmatory transitions corresponded to the loss of  $[\text{Br}_2]$  from the  $[\text{M}]^+$  for BDE-28, and for the other BDE congeners to the loss of  $[\text{COBr}]$  from  $[\text{M}-\text{Br}_2]^+$ . Transitions and optimal conditions are shown in **Table 1**.

When acquiring in selected reaction monitoring (SRM) mode, it is important to maximize chromatographic signal to noise ratios and it is also important that the peak to be quantified should be defined by at least 12 data points to assure a satisfactory peak shape and a reproducibility of area measurement. Accordingly, a scan time of 0.020 min was selected for the six time windows (segments) with a scan width of 0.002 Da.

### 3.1.2. Optimization of PTV-LV injection

The introduction of the sample into the gas chromatograph is a significant step, influencing sensitivity, accuracy, precision, and matrix effect. The targets of LVI set are clear: by increasing the sample volume, the detection limits of analytical methods can be decreased. PTV injection is one of the evaporating injection techniques where, as a rule, the sample is injected at a temperature below the boiling point of the solvent. Only after the injection in the PTV, with a defined speed, it is heated up to the necessary temperature for a complete evaporation of the solvent, which is eliminated through the split valve, and then the analytes are transferred into the column [31].

Large-volume injection into a PTV system can be done in three different modes [25,29]: (1) at-once, (2) speed-controlled injection, and (3) multiple injection. The first two modes can be used with the "BEST PTV". At-once injection was selected as injection mode to simplify the optimization process.

Four factors were selected for optimization: injection temperature ( $T_{\text{inlet}}$ ), vaporization temperature ( $T_{\text{vap}}$ ), vaporization time ( $t_{\text{vap}}$ ) and flow of the evaporation step (Flow).

A design of experiment approach (DoE) using a central composite design (CCD) [26,32] was used to optimize these PTV parameters. This type of experimental design permits to build up the response surface for each compound, and to find the factor settings (operating conditions) that maximize the injection efficiency for all analytes. The CCD consisted of a full factorial  $2^4$  design (16 hypercube points), 8 axial points and 7 central points in the cube, involving a total of 31 randomized chromatographic runs.

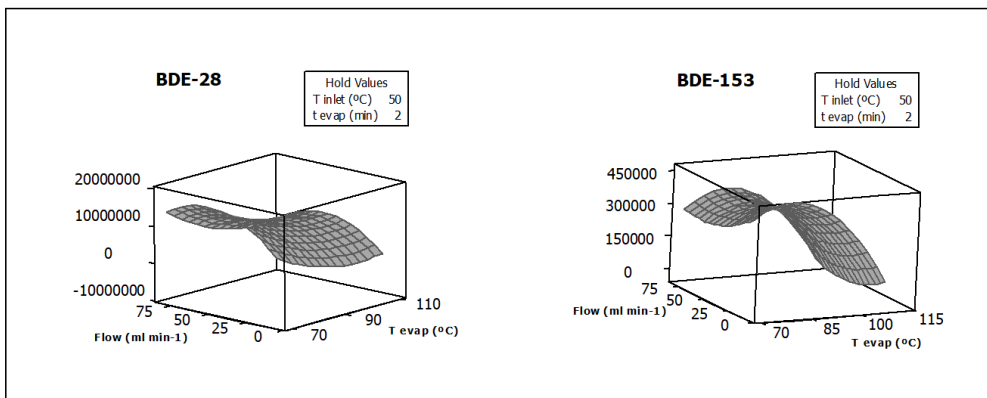
**Table 2.** Experimental conditions of the central composite design (CCD) used for the optimization of the programmable temperature vaporizer large-volume injection and obtained responses (as peak area in arbitrary units) for BDE-28 and BDE-153.

Run	$T_{inlet}$	$T_{vap}$	$t_{vap}$	Flow	Response ( $10^5$ )	
Order	(°C)	(°C)	(min)	( $mL\ min^{-1}$ )	BDE-28	BDE-153
1	62.5	100	1.55	27.5	109.5	3.4
2	75.0	90	1.10	80.0	119.2	3.5
3	87.5	80	1.55	27.5	22.3	0.7
4	100.0	90	1.10	45.0	12.6	0.3
5	87.5	100	0.65	62.5	102.6	3.5
6	62.5	80	0.65	27.5	146.3	3.5
7	75.0	90	1.10	10.0	169.2	4.2
8	75.0	90	1.10	45.0	122.9	3.7
9	75.0	90	1.10	45.0	115.1	3.6
10	87.5	80	0.65	62.5	13.5	0.4
11	87.5	100	0.65	27.5	123.1	3.7
12	62.5	80	1.55	27.5	132.0	3.4
13	87.5	100	1.55	27.5	108.1	3.3
14	75.0	90	1.10	45.0	117.6	3.6
15	62.5	100	0.65	27.5	104.0	3.1
16	87.5	80	0.65	27.5	20.1	0.4
17	75.0	110	1.10	45.0	77.0	2.8
18	62.5	80	1.55	62.5	111.6	3.0
19	75.0	90	0.20	45.0	152.3	3.5
20	75.0	90	1.10	45.0	104.9	3.2
21	75.0	90	2.00	45.0	104.4	3.0
22	62.5	80	0.65	62.5	119.5	3.0
23	75.0	70	1.10	45.0	20.4	0.3
24	87.5	100	1.55	62.5	82.7	3.1
25	62.5	100	1.55	62.5	87.5	3.3
26	75.0	90	1.10	45.0	108.2	3.0
27	87.5	80	1.55	62.5	23.6	0.2

28	50.0	90	1.10	45.0	81.5	3.0
29	75.0	90	1.10	45.0	99.5	3.2
30	75.0	90	1.10	45.0	98.5	3.0
31	62.5	100	0.65	62.5	81.3	2.7

Each one of these experiments was carried out with the injection of 20 µL of a standard solution of 12 PBDEs. Transfer temperature and cleaning temperature were fixed at 350 °C during 1 min, and 350 °C during 5 min with the split valve open (300 mL min<sup>-1</sup>) respectively. The design matrix with values corresponding to every factor in each run and the analytical response for two compounds (BDE-28 and BDE-153) are shown in **Table 2** as an example.

As an instance, **Fig. 1** shows the three-dimensional response surface for two factors at a constant value of the other two factors (fixed values: T<sub>inlet</sub> = 50 °C, t<sub>vap</sub> = 2 min) for BDE-28 and BDE-153. The factor settings that maximize the peak area of the compound were selected using the "response optimizer" found in MINITAB software. The optimized factor settings were T<sub>inlet</sub>: 50 °C, T<sub>vap</sub>: 80 °C, t<sub>vap</sub>: 2 min and Flow: 10 mL min<sup>-1</sup>. These factors provided a composite desirability of 0.996.



**Fig. 1.** Response surfaces obtained for BDE-28 and BDE-153. Fixed conditions: T<sub>inlet</sub> = 50 °C and t<sub>vap</sub> = 2 min.

### 3.2. Optimization of MAE conditions

To quantitatively extract PBDEs from fine particulate matter, MAE was the extraction procedure selected. This technique is an attractive alternative to conventional ones, and it has been successfully applied to the extraction of different families of emerging pollutants (including compounds with very different physicochemical properties), from a wide range of environmental samples. It is a

well-known fact that microwave-assisted extraction (MAE) allows the reduction of both extraction time and organic solvent consumption and increases sample throughput [1]. Chen et al. used MAE to extract PBDEs from glass-fiber filters obtaining good recoveries [4].

The main parameters influencing MAE performance such as solvent, temperature, time and extraction volume [1] were studied and optimized.

### 3.2.1. Study of extraction solvents

In order to select an appropriate solvent for quantitative extraction of all PBDEs from atmospheric particulate matter, a comparative study was performed using three different mixtures of solvents, commonly employed in extraction of these compounds from environmental matrices: n-hexane:acetone (1:1, v/v), n-hexane:dichloromethane (9:1, v/v) and n-hexane:water (10:1, v/v). These three mixtures of solvents possess a suitable polarity and a proper permittivity ( $\epsilon$ ) to absorb the microwave energy and to transform it into thermal energy [1]. Furthermore, these solvents have been described to have a high selectivity toward the analytes of interest [4,9,32].

Microwave extractions were performed on spiked field blank samples (7.6 ng added) with one 10-min cycle, using 30 mL of each mixture of solvents and an extraction temperature of 80 °C. **Table 3** illustrates the effect of the three mixtures of solvents on the absolute recoveries (calculated comparing absolute responses with that of a standard solution of 50 ng mL<sup>-1</sup>) of the different PBDEs, extracted from PM<sub>2.5</sub> filters. Statistical analysis of the obtained data was carried out using a two-sample t-test approach at 95% significance level and no significant differences were found between them.

The three mixtures presented similar recoveries for lower brominated congeners (between 47% and 58% for BDE-47). Although there were no significant differences, the highest recovery for high brominated congeners was observed in n-hexane:acetone (1:1, v/v) (60% against 45 and 46% for BDE-183). Consequently, it was selected as extraction solvent. Despite relative standard deviation (RSD) in n-hexane:acetone (1:1, v/v) was higher than in the other solvents, it was expected that precision could be improved optimizing the extraction method. This is in accordance with the data reported by Chen et al. [4], where PBDEs were extracted from air samples using n-hexane:acetone (1:1, v/v) as extraction solvent.

**Table 3.** Effect of extraction solvent on absolute recoveries (without internal standard correction) of PBDEs from spiked PM2.5 filters (n = 4).

Compounds	Solvents					
	n-Hexane:Acetone (1:1,v/v)		n-Hexane:Water (1:1,v/v)		n-Hexane:Dichloromethane (9:1, v/v)	
	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)	R (%)	RSD (%)
BDE 28	54	11	50	4	54	8
BDE 47	53	10	47	6	58	7
BDE 49	52	11	46	3	50	8
BDE 66	54	10	48	3	55	8
BDE 99	53	10	46	3	55	9
BDE 100	54	9	45	3	55	7
BDE 119	53	8	43	4	51	7
BDE 139	55	14	57	2	58	12
BDE 153	54	13	42	3	43	9
BDE 154	55	13	42	1	43	12
BDE 155	57	13	42	2	43	11
BDE 183	60	14	45	2	46	11

### 3.2.2. Optimization of MAE parameters

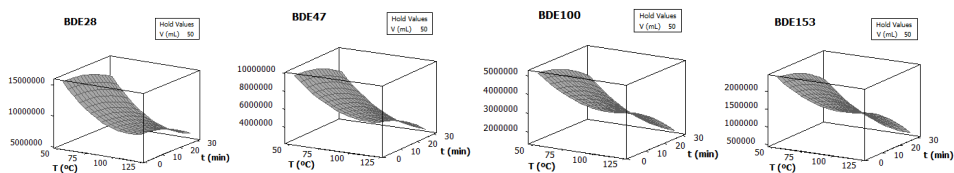
Once n-hexane:acetone (1:1, v/v) was selected as the extraction solvent, the optimization of the three main factors affecting MAE recoveries (solvent volume, exposure time and temperature) was carried out by a central composite design (CCD) [32]. The CCD selected was composed of a full factorial  $2^3$  design (8 hypercube points), 6 axial points and 6 central points in the cube. The 20 runs were randomized to provide protection against the effects of hidden variables and were carried out with spiked PM<sub>2.5</sub> field blank samples (7.6 ng added). The design matrix and the analytical response for four compounds (BDE-28, BDE-47, BDE-100 and BDE-153) are shown in **Table 4** as an example. The microwave power was fixed to 600 W.

A three-dimensional response surface shows the effect of two independent variables on a given response, at a constant value of the other independent variable. **Fig. 2** presents, as an example, some response surfaces developed by the model for BDE-28, BDE-47, BDE-100 and BDE-153 at a constant value of solvent volume (50 mL). To select the factor settings that maximize the twelve compound responses it was used the "response optimizer" from response surface design in MINITAB program. This parameter maximizes simultaneously the desirability for each compound. The optimized factor settings were time of 2 min, temperature of 75 °C and solvent volume of 50 mL. These conditions provided a composite desirability of 0.979.



**Table 4.** Experimental conditions of the central composite design (CCD) used for the optimization of MAE conditions and obtained responses (as peak area in arbitrary units) for BDE-28, BDE-47, BDE-100 and BDE-153.

Run Order	Temperature (°C)	Time (min)	Volume (mL)	Response (10 <sup>6</sup> )			
				BDE-28	BDE-47	BDE-100	BDE-153
1	64	8	44	11.1	6.8	3.6	1.6
2	106	8	44	10.3	6.4	3.8	1.7
3	64	24	26	8.7	5.3	2.8	1.3
4	106	8	26	7.8	4.7	2.6	1.2
5	85	16	20	8.5	5.0	2.6	1.1
6	85	16	35	9.6	6.0	3.3	1.5
7	85	16	35	11.1	7.1	3.8	1.7
8	120	16	35	7.2	4.3	2.7	1.2
9	64	8	26	9.8	5.7	2.8	1.2
10	85	16	35	8.1	5.0	2.7	1.2
11	85	30	35	9.9	6.2	3.7	1.6
12	106	24	26	7.9	4.7	2.9	1.3
13	106	24	44	7.9	4.4	2.5	1.1
14	50	16	35	19.4	12.2	6.1	2.8
15	64	24	44	10.3	6.1	3.1	1.4
16	85	2	35	10.6	6.7	3.5	1.5
17	85	16	35	10.2	6.4	3.6	1.6
18	85	16	50	9.9	6.3	3.7	1.7
19	85	16	35	10.0	6.2	3.4	1.4
20	85	16	35	10.5	6.5	3.8	1.7



**Fig. 2.** Response surfaces obtained for BDE-28, BDE-47, BDE-100 and BDE-153. Fixed conditions: volume, 50 mL n-hexane:acetone (1:1, v/v).

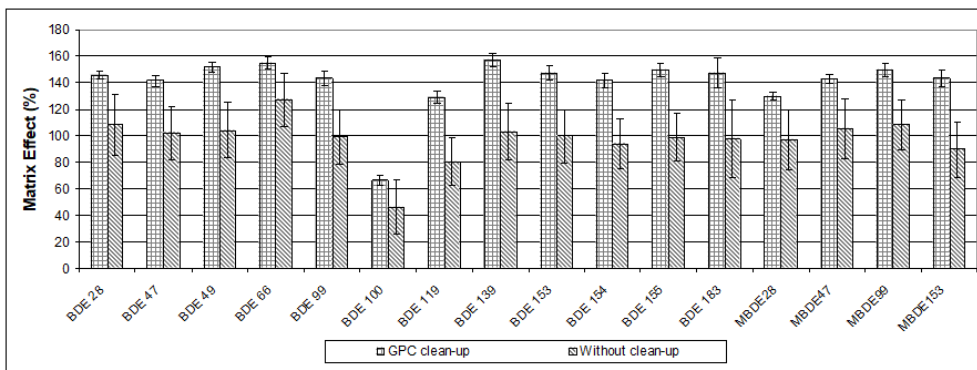
### 3.3. Matrix effect study

The matrix effect was evaluated by comparing the response of reference standards prepared in pure solvent (A, n = 5) with the response of matrix-matched standards (B, n = 5) with this formula:

$$\text{ME\%} = \frac{B}{A} \times 100$$

The matrix effect results are shown in **Fig. 3**. Lower matrix effect was obtained without GPC clean-up step. However, it produced an unacceptable variability in analyte signals, leading to high relative standard deviations (RSD) between 18% (BDE-154) and 29% (BDE-183). This high variability is reduced when extracts are purified by GPC, leading to RSD ranging from 3% (BDE-28) to 11% (BDE-183). However, some matrix effect (mainly enhancement) (see **Fig. 3**) is still present but it could be corrected by using matrix matched calibration using relative responses to internal standards thus avoiding the consequences of matrix effects on the reliability (accuracy and precision) of the data.

Contrary to LC-MS, in which signal suppression is the more usual matrix effect; in GC-MS an enhancement of the signal appears frequently. This enhancement has been associated with the inactivation of some injector active sites by the matrix [33]. In this case, it is not easy to explain why matrix effects are increased (enhancement) after GPC clean-up. Maybe the GPC clean-up could remove some substances that are avoiding or hampering the inactivation of the active sites by some components of the matrix.



**Fig. 3.** Matrix effect obtained for each PBDE with and without clean-up (n = 5). Mean values are plotted together with relative standard deviations.

### 3.4. Analytical performance of the method

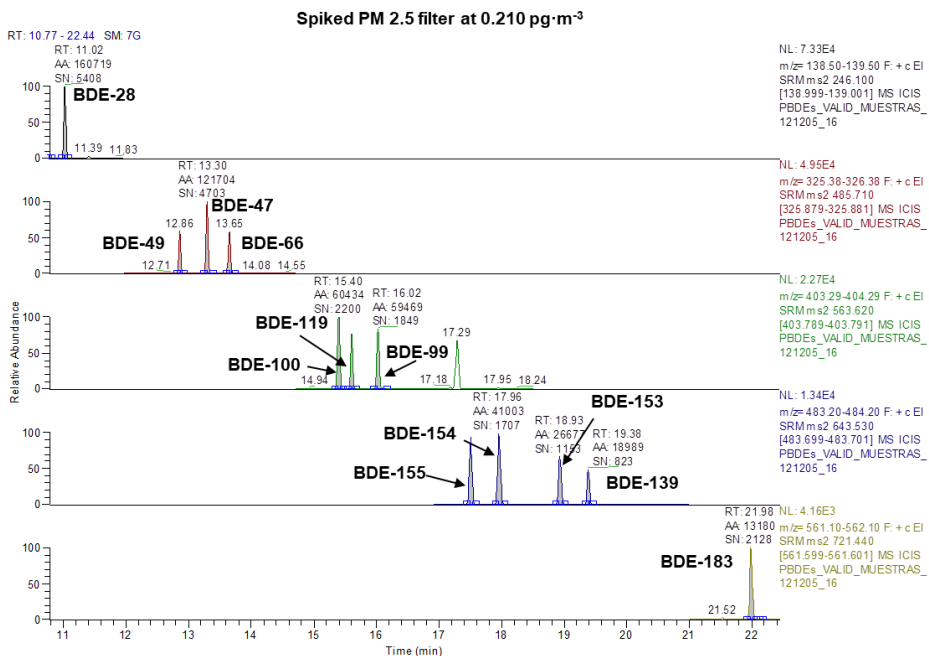
Matrix-matched calibration plots (relative areas to internal standard) showed good linearity with correlation coefficients ( $R^2$ ) higher than 0.99 in the concentration range of 0.3 and 10 ng mL<sup>-1</sup> in vial, with individual residual deviations less than 20%. The specificity of the method was tested by analysis of blank samples. The absence of any chromatographic peak at exactly the same retention time of the target PBDEs indicated that there were no matrix compounds that might give a false positive signal in these samples.

Accuracy and precision were estimated by means of recovery experiments (n = 9) at two concentration levels (LoQ for every PBDEs and 2.104 pg m<sup>-3</sup>). **Table 5** shows the results obtained for each compound. As it can be observed, mean relative recoveries ranged from 80% to 106% with relative standard deviations lower than 18%. The LoQ ranged from 0.063 to 0.210 pg m<sup>-3</sup>, when air volumes of 723 m<sup>3</sup> were collected (see **Table 5**). These limits are lower than those achieved by other methods published recently. Chen et al. [14] worked with detection limits in the range from 0.15 to 0.65 pg m<sup>-3</sup> [14], detection limits ranged from 0.11 to 0.17 pg m<sup>-3</sup> in Li et al. [7] study, and Wang et al. obtained detection limits from 0.51 to 2.69 pg m<sup>-3</sup> [19]. **Fig. 4** shows a chromatogram for every PBDE of a spiked PM2.5 field sample at 0.210 pg m<sup>-3</sup>.

**Table 5.** Accuracy expressed as average relative recovery rate and precision as relative standard deviation (RSD) from spiked PM2.5 filters (n = 9).

Compounds	Low level <sup>(a)</sup> (LoQ)		High level <sup>(b)</sup>	
	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
BDE-28	106	8	100	5
BDE-49	100	9	97	4
BDE-47	102	18	101	3
BDE-66	80	17	97	4
BDE-100	82	10	102	2
BDE-119	95	15	103	2
BDE-99	94	16	100	3
BDE-155	96	17	100	9
BDE-154	96	15	100	3
BDE-153	103	8	100	4
BDE-139	104	5	101	3
BDE-183	98	5	106	4

- (a) LoQ equal to 0.063 pg m<sup>-3</sup> for BDE-28, BDE-49, BDE-47, BDE-66 and BDE-100; 0.105 pg m<sup>-3</sup> for BDE-119 and BDE-99; 0.210 pg m<sup>-3</sup> for BDE-155, BDE-154, BDE-153, BDE-139 and BDE-183.
- (b) High level equal to 2.104 pg m<sup>-3</sup> for all compounds.



**Fig. 4.** Chromatograms corresponding to a spiked PM 2.5 sample at 0.210 pg m<sup>-3</sup>.

### 3.5. Analysis of real samples

In order to study the applicability of the methodology developed, eight samples were collected in a residential station situated in Elche (south of Alicante province, Valencia region) during the spring and summer (April–August) in 2012. The results obtained are shown in **Table 6**. **Fig. 5** shows a chromatogram of a positive sample for BDE-47 and BDE-99 collected in Elche during May 2012. BDE-100, BDE-154, BDE-153 and BDE-183 were found in concentrations below LoQ in the majority of the samples.

BDE-47 and BDE-99 were also found in all samples and they could be quantified in 6 and 5 out of the eight samples analyzed respectively. The concentrations ranged from 0.063 pg m<sup>-3</sup> to 0.112 pg m<sup>-3</sup> for BDE-47 and from 0.107 pg m<sup>-3</sup> to 0.212 pg m<sup>-3</sup> for BDE-99.

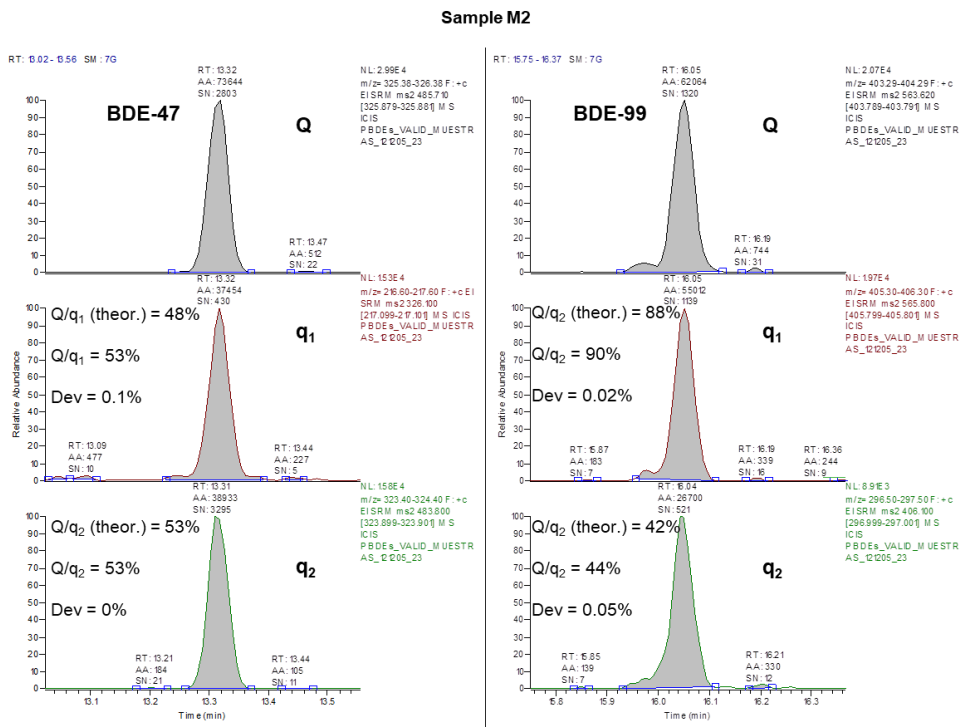
Several studies carried out in the last years have reported the presence of the same two compounds, even with higher occurrence. In a Mediterranean coastal site in France, the dominant congeners found were BDE-47 (45 ± 0.5%) and BDE-99 (39 ± 0.2%) [34]. In northern China, Wang et al. found that BDE-47 contributed 71 ± 11% of the total PBDEs with a mean concentration of 6.2 pg m<sup>-3</sup> for this congener. The same authors indicated that for BDE-99 mean concentration was 0.35 pg m<sup>-3</sup> [19].

**Table 6.** Concentrations of PM 2.5-bound PBDEs (pg m<sup>-3</sup>) in Elche station of Alicante region (Spain), (N = 8).

PBDEs	n > LoQ	Conc. Range (pg m <sup>-3</sup> )	Mean <sup>a</sup>
BDE-28	-	-	-
BDE-49	-	-	-
BDE-47	6	0.063 - 0.112	0.077
BDE-66	-	-	-
BDE-100	-	-	-
BDE-119	-	-	-
BDE-99	5	0.107 - 0.212	0.136
BDE-155	-	-	-
BDE-154	-	-	-
BDE-153	-	-	-
BDE-139	-	-	-
BDE-183	-	-	-
ΣPBDEs		0.170 - 0.324	0.213

N, total samples; n, number of samples.

<sup>a</sup> Mean concentrations were calculated from values above LoQ.



**Fig. 5.** Chromatograms corresponding to a positive sample (M2) for BDE-47 and BDE-99.

**4. Conclusions**

A sensitive and selective method to analyze 12 PBDEs in fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) has been developed. The method is based on an extraction of PBDEs by MAE followed by GPC clean-up and large volume injection with PTV into GC-MS/MS. Our quantification limits (0.063 – 0.210 pg m<sup>-3</sup>) are lower than the detection limits obtained in these other studies. Consequently, the use of PTV and MS/MS detection provides an improvement of the method sensitivity and selectivity.

The GC-MS/MS with triple quadrupole analyzer has proven to be a very suitable tool for PBDEs analysis in ambient air. The selection and optimization of three MRM transitions, gives excellent sensitivity and selectivity and the identification criteria established by the European Union could be achieved.

This method could be used in the monitoring programs of PBDEs in atmospheric air using the network of samplers which already exist in many countries to control fine particulate matter.

However, this method does not include the analysis of BDE-209. The determination of BDE-209 is one of the most challenging in the gas chromatographic analysis due to the still extensive use of DecaBDE technical mixture. For this reason, the presence of BDE-209 in the environment is relevant. The analysis BDE-209 is difficult due to thermal degradation and requires the use of shorter columns [35]. This is the reason why, an additional effort needs to be done to include BDE-209 in the future developments of our method.

### **Acknowledgements**

We gratefully thank Anna Gonzalez and Lucía Alonso for technical assistance in sample preparation and for their collaboration in the laboratory work. We also gratefully thank to the Atmospheric Contamination Service of the Generalitat Valenciana for providing us the field samples.

### **References**

- [1] S. Król, B. Zabiegala, J. Namiesnik, *Talanta* 93 (2012) 1.
- [2] A. Eguchi, T. Isobe, K. Ramu, S. Tanabe, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91 (4) (2011) 348.
- [3] S.A. Mackintosh, A. Pérez-Fuentetaja, L.R. Zimmerman, G. Pacepavicius, M. Clapsadl, M. Alaee, D.S. Aga, *Anal. Chim. Acta* 747 (2012) 67.
- [4] Y. Chen, J. Li, L. Liu, N. Zhao, *J. Environ. Manage.* 113 (2012) 22.
- [5] J. Náchter-Mestre, R. Serrano, F. Hernández, L. Benedito-Palos, J. Pérez-Sánchez, *Anal. Chim. Acta* 664 (2010) 190.
- [6] U.S. EPA, *An Exposure Assessment of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDE) (Final)*, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2010, EPA/600/R08/086F.
- [7] J. Li, Q. Li, R. Gioia, Y. Zhang, G. Zhang, X. Li, B. Spiro, R.S. Bathia, K.C. Jones, *Atmos. Environ.* 45 (2011) 6622.

- [8] X. Querol, A. Alastuey, C.A.R. Ruiza, B. Artinanob, H.C. Hansson, R.M. Harrison, E. Buringh, H.M. ten Brink, M. Lutz, P. Bruckmann, P. Straehl, J. Schneider, *Atmos. Environ.* 38 (2004) 6547.
- [9] W.E. Wilson, J.C. Chow, C. Claiborn, W. Fusheng, J. Engelbrecht, J.G. Watson, *Chemosphere* 49 (2002) 1009.
- [10] Council Directive 1999/30/EC of 22 April 1999, *Off. J. Eur. Commun.* L 163/41, 29.6.1999.
- [11] Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe, *Official Journal of the European Union* L152/1, 11.06.2008.
- [12] D. Chen, X. Bi, M. Liu, B. Huang, G. Sheng, J. Fu, *Chemosphere* 82 (2011) 1246.
- [13] S. Batterman, C. Godwin, S. Chernyak, C. Jia, S. Charles, *Environ. Int.* 36 (2010) 548.
- [14] D. Chen, X. Bi, J. Zhao, L. Chen, J. Tan, B. Mai, G. Sheng, J. Fu, M. Wong, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 1051.
- [15] B. Cetin, M. Odabasi, *J. Hazard. Mater.* 185 (2011) 784.
- [16] I. Weinberg, A. Dreyer, R. Ebinghaus, *Atmos. Environ.* 45 (2011) 935.
- [17] I. Weinberg, A. Dreyer, R. Ebinghaus, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 125.
- [18] L. Melymuk, M. Robson, P.A. Helm, M.L. Diamond, *Sci. Total Environ.* 429 (2012) 272.
- [19] C. Wang, W. Li, J. Chen, H. Wang, T. Li, G. Shen, H. Shen, Y. Huang, R. Wang, B. Wang, Y. Zhang, J. Tang, W. Liu, X. Wang, S. Tao, *Environ. Pollut.* 171 (2012) 234.
- [20] L. Sanchez-Prado, C. Garcia-Jares, M. Llompарт, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2390.
- [21] T. Martellini, K.C. Jones, A. Sweetman, M. Giannoni, F. Pieri, A. Cincinelli, *Environ. Pollut.* 169 (2012) 242.
- [22] A. Möller, Z. Xie, R. Sturm, R. Ebinghaus, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 1577.
- [23] I. Fulara, M. Czaplicka, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2075.



- [24] M. Abou, E. Abdallah, S. Harrad, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 3059.
- [25] V. Yusà, O. Pardo, A. Pastor, M. de la, Guardia, *Anal. Chim. Acta* 557 (2006) 304.
- [26] D.B. Hibber, *J. Chromatogr. B* 910 (2012) 2.
- [27] EN14907:2005. Ambient Air Quality – Reference gravimetric measurement method for the determination of the PM<sub>2.5</sub> mass fraction of suspended particulate matter in ambient air. CEN, Brussels, 2005.
- [28] EN12341:1999. Air quality – Determination of the PM<sub>10</sub> fraction of suspended particulate matter – reference method and field test procedure to demonstrate reference equivalence of measurement methods. CEN, Brussels, 1998.
- [29] EPA Method 3640 A: Gel-Permeation Clean-up Revision 1, <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3640a.pdf>
- [30] EU, Commission of the European Communities 2002/657/EC, *Off. J. Eur. Commun.* L221 (2002) 8.
- [31] W. Engewald, J. Teske, J. Efer, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 259.
- [32] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, C.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Beke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [33] A. Garrido, J.L. Martínez, J.L. Fernández, R. Romero-González, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4798.
- [34] J. Castro-Jiménez, G. Mariani, I. Vives, H. Skejo, G. Umlauf, J.M. Zaldívar, S. Dueri, G. Messiaen, T. Laugier, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 1948.
- [35] A. Besis, C. Samara, *Environ. Pollut.* 169 (2012) 217.

#### 4. DISCUSIÓN

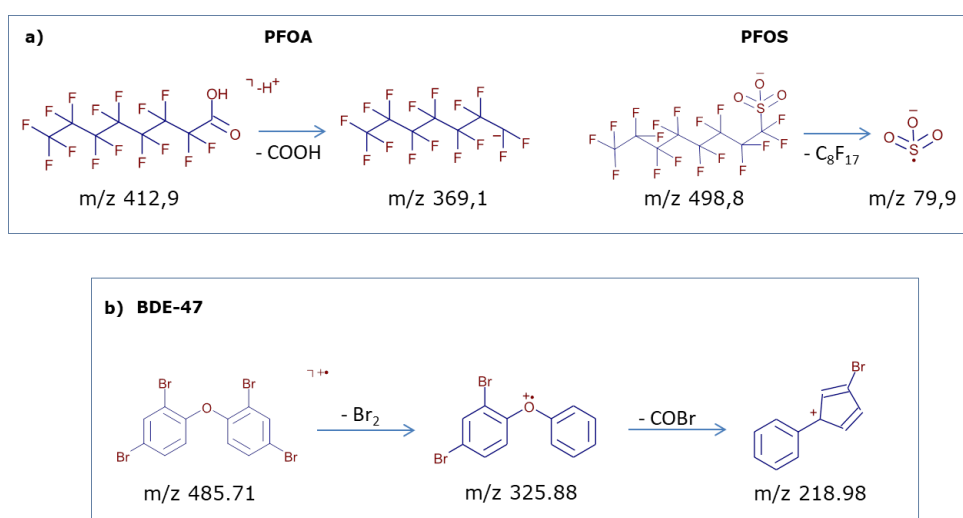
En los dos trabajos incluidos en el presente capítulo, se han desarrollado y validado dos metodologías analíticas para la determinación de dos grupos de sustancias diferentes, ambas clasificadas como contaminantes emergentes, PFAS y PBDEs, en la fase particulada del aire. Para ello, en primer lugar, ha sido necesaria la optimización adecuada de diferentes etapas consideradas como primordiales o prioritarias dentro de cada una de las metodologías; en segundo lugar, se ha realizado la validación de ambos procedimientos siguiendo los criterios de calidad exigidos en la Decisión de la Comisión 2002/657/CE (Commission Decision 2002/657/EC 2002); y por último, dichos procedimientos han sido aplicados a muestras de campo.

Tanto en el **Artículo Científico 1** como en el **Artículo Científico 2**, se optimizaron, inicialmente, las condiciones cromatográficas e instrumentales del LC-MS/MS y del GC-MS/MS, respectivamente. Para ello, en el análisis de las PFAS en el LC, se tuvieron en cuenta diferentes composiciones de fase móvil, como metanol:agua o acetonitrilo:agua trabajando con un mismo gradiente en ambos casos y con la misma columna cromatográfica, Luna C<sub>18</sub> (150 mm x 2 mm I.D., 5 µm, Phenomenex). Se obtuvo un mejor perfil cromatográfico, es decir, menor ruido de fondo y picos más estrechos con metanol:agua. Además, se tuvieron en cuenta también varios modificadores: sal de acetato amónico y tampón acetato amónico/ácido acético, a distintas concentraciones. Se concluyó, después de las pruebas pertinentes, que un aumento progresivo del contenido de ácido acético repercutía en una disminución también progresiva de la respuesta de la mayoría de los analitos. Sin embargo, la adición solo de una sal como el acetato amónico a distintas concentraciones, tanto en la fase acuosa como en la fase orgánica de la fase móvil, aumentaba el pH de la misma, favoreciendo la desprotonación de las PFAS y aumentando así las respuestas de los analitos de manera considerable. Por tanto, se decidió usar como modificador acetato amónico a una concentración de 5 mM, que fue con la que se obtuvieron mejores respuestas. En cuanto a la optimización de las condiciones de la espectrometría de masas en tándem, en el caso de las PFAS, se realizó mediante infusión de disoluciones patrón individuales de cada uno de los analitos directamente en el MS, seleccionando el ión precursor más abundante para cada uno de ellos, los iones producto, y por

tanto, las posibles transiciones a tener en cuenta. La fuente de ionización utilizada fue la ionización por electrospray y el modo de ionización adecuado, tratándose de sustancias ácidas (PFCAs y PFSAAs), que se encuentran en su forma aniónica disociada, desprotonada, más que en su forma ácida protonada (ITRC 2017), era el negativo. Por tanto, se optó por el ión  $[M-H]^-$  como ión precursor por ser, además, el que presentaba mayor señal. Las transiciones más abundantes fueron las utilizadas para la cuantificación, que en el caso de los PFCAs y PFSAAs, se correspondían con la pérdida del grupo carboxilo,  $m/z [M-COOH]^-$ , y del fragmento  $m/z [SO_3]^-$ , respectivamente; excepto para el 6:2 FTS para el cual se seleccionó el fragmento  $m/z [HF]^-$ , como ejemplo, se muestran en la **Figura 12a** los fragmentos correspondientes al PFOA y PFOS. También mediante infusión de las disoluciones patrón, se optimizaron la energía de colisión (CE) y el parámetro “*tube lenses*” con el fin de maximizar la señal de los analitos.

En cuanto al análisis instrumental de PBDEs mediante GC-MS/MS, se utilizó una columna cromatográfica típica, cuya fase estacionaria 95% dimetil-5% difenilpolisiloxano abarca un gran número de aplicaciones, de dimensiones estándar 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25  $\mu$ m. La separación cromatográfica de los PBDEs se llevó a cabo mediante un programa de temperaturas ya optimizado por el laboratorio en estudios anteriores. En cambio, la optimización de las condiciones espectrométricas fue necesaria para alcanzar la máxima señal. En primer lugar, se obtuvieron los iones característicos de cada analito, los más abundantes o selectivos, mediante inyección de los patrones correspondientes, con el fin de utilizarlos como iones precursores. Seguidamente se realizó un scan de iones producto, fijando uno o varios iones precursores mediante una rampa de energías de colisión de 5 a 30 eV, se obtuvieron una serie de iones producto. De las distintas transiciones se seleccionaron aquellas cuyos iones producto presentaban una mayor señal de área tanto para la cuantificación como para la confirmación. Una vez seleccionadas, se procedió a la optimización de las energías de colisión. Las transiciones seleccionadas fueron las que se indican: i) para la cuantificación, las resultantes de fragmentar el ión molecular ionizado  $m/z [M]^+$  y monitorizando su fragmento  $m/z [M-Br_2]^+$ , excepto para el BDE-28, cuya transición se correspondía a la pérdida de masa  $m/z [COBr]$  del ión precursor con  $m/z [M-Br_2]^+$ ; ii) para la

confirmación, por el contrario, las transiciones seleccionadas se correspondían con la pérdida de  $m/z$   $[\text{Br}_2]$  del ión precursor  $m/z$   $[\text{M}]^+$  (BDE-28), y con la pérdida de  $m/z$   $[\text{COBr}]$  del ión  $m/z$   $[\text{M}-\text{Br}_2]^+$  para el resto de analitos. A modo de ejemplo, en la **Figura 12b**, se muestran los iones presurores y productos en sus formas moleculares correspondientes a las transiciones seleccionadas para la cuantificación y confirmación del BDE-47. El fragmento correspondiente a la pérdida de masa  $m/z$   $[\text{COBr}]$  ha sido deducido a partir del mecanismo de fragmentación propuesto por Riu et al. (Riu et al. 2006).



**Figura 12. a)** Iones precursores e iones producto (fragmentos) utilizados para la cuantificación del PFOA y del PFOS; **b)** Iones precursores y productos (fragmentos) del BDE-47 seleccionados para su cuantificación y confirmación.

Según los requisitos de nuestro laboratorio se establece un mínimo de 12 puntos por pico (*scans*), para ello fue necesario optimizar el parámetro de *scan time* y de *scan width*.

Continuando con las optimizaciones llevadas a cabo en ambas metodologías desarrolladas, ocurre que en algunos casos, los factores o parámetros a optimizar pueden ser dependientes unos de otros y presentar cierta correlación entre ellos, lo que hace que aumente el número de experimentos a realizar. Por este motivo, como ya se ha mencionado en la introducción

general de la presente **Tesis doctoral**, es conveniente hacer uso de una optimización multivariante mediante diseño experimental.

En el caso de los PBDEs (**Artículo Científico 2**), se utilizó el DoE, en primer lugar, para la optimización de la inyección de grandes volúmenes mediante PTV, y en segundo lugar, al igual que en **Artículo Científico 1**, para la optimización de la extracción asistida con microondas.

#### DoE para la optimización de la inyección de grandes volúmenes mediante PTV

En cromatografía de gases, la inyección de la muestra es uno de los pasos determinantes que puede afectar a la sensibilidad, exactitud y precisión del método. El diseño experimental elegido fue el diseño de composición central o CCD, el cual permite conocer las superficies de respuesta de cada analito y obtener así las condiciones que maximicen la eficacia de la inyección para todos ellos. Los parámetros seleccionados para su optimización y sus valores mínimos y máximos establecidos fueron: temperatura de inyección (50 – 100 °C), temperatura de vaporización (70 – 110 °C), tiempo de vaporización (0.20 – 2.00 min) y flujo de la evaporación (10 – 80 mL/min). El CCD consistió en un diseño factorial completo  $2^4$ , por tanto, 16 puntos hipercubo, 8 puntos axiales y 7 puntos centrales en el cubo, que resultó en 31 experimentos aleatorios. Cada uno de estos experimentos se llevó a cabo mediante inyección de una disolución patrón que contenía los 12 PBDEs, manteniendo otros parámetros, considerados menos influyentes, constantes. Éstos fueron, el volumen de inyección, que se estableció en 20  $\mu\text{L}$ , la temperatura de transferencia fue fijada a 350 °C durante 1 minuto, y la de limpieza también a 350 °C durante 5 minutos con la válvula de *split* abierta y con un flujo de 300 mL/min. Las condiciones óptimas fueron de 50 °C para la temperatura de inyección, de 80 °C para la de vaporización durante 2 minutos a un flujo de 10 mL/min, obteniendo una deseabilidad global de 0.996.

La siguiente etapa a optimizar fue la extracción asistida con microondas. Para ello se seleccionaron los parámetros más relevantes, los cuales fueron: disolvente de extracción, volumen del mismo, temperatura y tiempo de extracción. Por tanto, inicialmente, se procedió a valorar los posibles disolventes o mezcla de disolventes. En el caso de los PBDEs los disolventes

óptimos para su extracción de la fase particulada del aire deben ser apolares, pero ello implica que su constante dieléctrica sea baja y por tanto no sean beneficiosas para una extracción por MAE. Por ello, se valoraron tres mezclas de disolventes distintas, aportando con uno de los disolventes de la mezcla la permitividad necesaria. Las mezclas que se tuvieron en cuenta fueron, n-hexano:acetona (1:1, v/v), n-hexano:agua (10:1) y n-hexano:diclorometano (9:1, v/v). Por el contrario, en el caso de las PFAS, los disolventes típicos para una extracción eficaz de las PFAS de la matriz presentan una constante dieléctrica más elevada, y no se requiere de mezclas de otros disolventes para realizar ese aporte. Por tanto, los disolventes de extracción estudiados en este caso fueron, acetona, metanol y acetato de etilo. En ambos estudios se llevó a cabo mediante el uso de filtros de campo blancos, fortificados con una disolución que contenía los compuestos estudiados. En el caso de los PBDEs el programa utilizado en el MAE fue de un ciclo de 10 minutos, a 80 °C y con un volumen de disolvente de 30 mL. Para los PFAS, se utilizó un programa de 15 minutos de ciclo, a 50 °C y con un volumen también de 30 mL. La principal diferencia entre ambas metodologías es que habitualmente en MAE se hace uso de vasos de teflón; sin embargo, este tipo de material es necesario eliminarlo del proceso para evitar contaminación en la determinación de PFAS. Por tanto, se utilizó otro MAE, el cual disponía de vasos de cuarzo. Los resultados obtenidos en ambos estudios dieron lugar a las siguientes conclusiones:

- Para las PFAS, con acetona, se obtuvo un intervalo de recuperaciones de 45 – 130% con RSDs de 1 – 23%; con metanol, las recuperaciones y precisión obtenidas fueron de 54 – 122% y 5 – 18%, respectivamente; y con acetato de etilo, las recuperaciones fueron de 12 – 124% y con RSDs elevadas de 20 – 41%. A la vista de estos resultados, el acetato de etilo fue descartado de manera inmediata por las bajas recuperaciones de muchas de las PFAS, sobre todo, las de cadena larga, y por las RSD elevadas para la mayoría de ellas. Por lo que corresponde al uso de acetona o metanol como disolventes de extracción, aunque no se observaron diferencias significativas en cuanto a las recuperaciones obtenidas, prestando atención a los resultados de precisión en ambos casos,

fueron algo más precisos para el metanol, por lo que éste fue el disolvente de extracción seleccionado.

- Para los PBDEs, no se observaron diferencias de recuperación significativas: con n-hexano:acetona (1:1, v/v) de 52 - 60% y RSDs de 8 - 14%; con n-hexano:agua (10:1, v/v) de 42 - 57% con RSDs de 1 - 6%; y con n-hexano:diclorometano (9:1, v/v) de 43 - 58% y RSDs de 7 - 12%; si bien es cierto, que si se presta atención a los PBDEs con pocos bromos o a los altamente bromados, se observan mayores recuperaciones para estos últimos cuando se utiliza n-hexano:acetona (1:1, v/v), por tanto, esta mezcla de disolventes fue la seleccionada para la extracción de estas sustancias de la fase particulada del aire.

#### DoE para la optimización de la extracción asistida con microondas

Del mismo modo que con la optimización del PTV, para la optimización de los parámetros del MAE en ambos estudios, se eligió como diseño experimental un diseño de composición central. Los parámetros seleccionados y sus valores mínimos y máximos establecidos fueron: volumen de disolvente de extracción (10 - 30 mL para las PFAS, 20 - 50 mL para los PBDEs, esta diferencia en cuanto a los volúmenes es debida al tipo de vasos utilizados en cada caso), temperatura de extracción (50 - 120 °C en ambos casos) y tiempo de extracción (2 - 30 min, también en ambos casos). Ambos CCD consistieron en diseños factoriales completos 2<sup>3</sup>, dando lugar para cada CCD, a 8 puntos hipercubo, 6 puntos axiales y 6 puntos centrales en el cubo. Los 20 experimentos de cada uno de los estudios, fueron distribuidos de manera aleatoria y llevados a cabo mediante filtros PM2.5 de campo, blancos, fortificados con disoluciones patrón que contenían las sustancias a estudiar en cada caso, y manteniendo como valor fijo el de la energía o potencia de las microondas, en el caso de las PFAS fue de 1200 W, y en el de los PBDEs de 600 W (estas diferencias fueron debidas a las características del MAE utilizado en cada caso). Las condiciones óptimas con las que se obtuvo una deseabilidad global para las PFAS de 0.998 y para los PBDEs de 0.979 fueron: volumen de disolvente, 25 mL y 50 mL, respectivamente; temperatura de extracción, 120 °C y 75 °C, respectivamente; tiempo de extracción, 2 minutos en ambos estudios.

Una de las etapas evaluadas y estudiadas fue el efecto matriz (ME). Con dicho estudio se pretendía evaluar y valorar en qué medida afecta la matriz a la señal de los analitos, y si, a la vista de los resultados, se requería de etapas de purificación u otros procesos para eliminar o compensar dicho efecto matriz. Tanto en el **Artículo Científico 1** como en el **Artículo Científico 2**, el efecto matriz se evaluó por comparación entre las respuestas obtenidas de una disolución patrón que contenía las sustancias motivo de estudio, a una concentración determinada, y las obtenidas de fortificar el extracto de un filtro PM<sub>2.5</sub> de campo blanco con la misma disolución patrón.

Los resultados obtenidos mostraron que las PFAS de cadena corta (PFBA – PFHxS) no se veían afectadas por el efecto matriz, del 90% (PFHpA) al 119% (PFBS), alguna como el 6:2 FTS presentaba una supresión de la señal muy leve (75%), otras sustancias como el PFOA o PFHpS, mostraban supresión de la señal moderada (59 y 52%, respectivamente), y el PFNA, PFOS y PFDA fueron los que se veían más afectados por el efecto matriz, con una supresión muy fuerte de la señal (34, 35 y 20%, respectivamente). Por ello, se decidió evaluar, además, diferentes procesos de purificación e intentar así eliminar interferentes de la matriz. Se probó la técnica de extracción en fase sólida dispersiva con dos adsorbentes distintos, carbono grafitizado y C<sub>18</sub>, además se probó también, únicamente, con una centrifugación para que las posibles partículas que queden en el extracto final puedan ser eliminadas. Estas tres opciones, además, se comprobaron también adicionando al extracto 50 µL de ácido acético. Los resultados mostraron que el C<sub>18</sub> era el que daba recuperaciones significativamente más bajas para la mayoría de PFAS, por lo que fue, directamente, descartado. Comparando el carbono grafitizado con una única centrifugación, ambas con ácido acético, no se observaron diferencias significativas, si bien es cierto, que con carbono grafitizado se obtienen menores recuperaciones para las PFAS de cadena larga, como PFOS (52%) o PFDA (46%). Se compararon, entonces, las recuperaciones obtenidas, simplemente, con centrifugación, con y sin ácido acético. En este caso, al igual que en el anterior, no existían diferencias de recuperación significativas, aunque las desviaciones estándar relativas eran inferiores sin la adición del ácido acético, de 3% (PFPeA) a 38% (PFDA) con ácido acético, frente a 2% (PFHxS) – 7% (PFHpS). Con



todo esto, se eligió realizar, simplemente, una centrifugación de los extractos para eliminar los interferentes de la matriz.

Para los PBDEs se evaluó el efecto matriz del mismo modo, pero teniendo en cuenta el uso o no de una etapa de purificación mediante GPC. Los resultados sorprendieron inicialmente, ya que haciendo uso del GPC como purificación del proceso se obtuvo una exaltación de la señal considerable para la mayoría de los PBDEs (de 129% para el BDE-119 a 157% para el BDE-139), excepto para el BDE-100 que mostró supresión de la señal, tanto con purificación como sin ella (67% y 36%, respectivamente). Sin embargo, sin la etapa de purificación, la mayoría de los PBDEs resultaron no verse afectados por el efecto matriz, ni por exaltación ni por supresión. A pesar de ello se decidió hacer uso de esta etapa de purificación con GPC. Y esto fue debido a que, i) prestando atención a las desviaciones estándar relativas en ambos casos, como es lógico al haber variabilidad en el tipo de matriz, cuando no se utiliza purificación, las RSDs resultaron ser mucho mayores, desde 18% (BDE-154 y BDE-155) hasta 29% (BDE-183), en comparación con las obtenidas después de la purificación, desde 3% (BDE-28) hasta 11% (BDE-183); ii) la exaltación de señal obtenida después de la etapa de purificación, puede ser compensada, posteriormente, mediante el uso de calibración en matriz usando, además, patrones internos.

Una vez se tuvieron todas las etapas de ambas metodologías optimizadas, se llevaron a cabo las validaciones correspondientes siguiendo los criterios de calidad exigidos en la Decisión de la Comisión 2002/657/EC (Commission Decision 2002/657/EC 2002):

*Validación y protocolo de control de calidad para las PFAS en filtros PM2.5 del aire*

La validación se llevó a cabo usando muestras de filtros PM2.5 de campo, blancas, fortificadas. Las muestras blancas se obtuvieron de estaciones rurales, teniendo la precaución de someterlas a una temperatura de 150 °C durante 24 h para eliminar cualquier rastro de PFAS que pudiera haber.

En la **Tabla 3** se indican los parámetros estudiados en la validación del método, la manera en que han sido evaluados dichos parámetros y los resultados obtenidos para cada uno de ellos.

**Tabla 3.** Parámetros validados, cómo han sido evaluados y resultados de la validación de las PFAS.

Parámetros estudiados en la validación	Realización	Resultados
<b>Linealidad</b>	Curva de calibración con patrones internos, de 6 puntos por triplicado ( $R^2$ y desviaciones residuales individuales).	6 puntos de curva de 2 a 50 ng/mL en agua:metanol (65:35, v/v) $\rightarrow R^2 > 0.99$ y residuales $< 20\%$ , en todos los casos.
<b>Exactitud (recuperación)</b>	Análisis de muestras de campo blancas fortificadas a 3 niveles de concentración diferente. Las secuencias analíticas fueron de 3 días y 3 réplicas a cada uno de los niveles cada día.	Las recuperaciones relativas medias fueron desde el 83% (PFOA nivel bajo y PFDA nivel medio) al 120% (PFPeA nivel bajo). Niveles validados fueron: 1.4 pg/m <sup>3</sup> (1 ng/filtro), 14 pg/m <sup>3</sup> (5 ng/filtro) y 34.7 pg/m <sup>3</sup> (25 ng/filtro).
<b>Precisión (reproducibilidad)</b>	Análisis de muestras de campo blancas fortificadas a 3 niveles de concentración diferente. Las secuencias analíticas fueron de 3 días y 3 réplicas a cada uno de los niveles cada día.	Las desviaciones estándar relativas fueron desde 1% (PFPeA, nivel bajo) hasta 17% (PFOA, nivel medio), por tanto, en todos los casos fue $< 20\%$ .
<b>Selectividad</b>	Evaluar la ausencia de interferencias al mismo tiempo de retención que cualquiera de las PFAS estudiadas.	Se comprueba la ausencia de interferencias para cada uno de los analitos.
<b>Límite de cuantificación del método (MQL)</b>	Establecido como el nivel más bajo validado en el que se obtienen valores de recuperación y de precisión satisfactorios (80 - 120% y $< 20\%$ ).	MQL = 1.4 pg/m <sup>3</sup> . Recuperaciones = 83% - 120%. RSDs = 1 - 15%.
<b>Límite de detección del método estimado (MDL)</b>	Fue estimado a partir de los cromatogramas correspondientes al nivel del MQL, como 3 veces la S/N.	El MDL obtenido fue desde 0.03 pg/m <sup>3</sup> para el 6:2 FTS hasta 0.27 pg/m <sup>3</sup> para el PFBA.
<b>Identificación y confirmación</b>	Cumplir con los criterios de confirmación establecidos en la Decisión de la Comisión 2002/657/EC.	<ul style="list-style-type: none"> <li>i) 2 transiciones por analito, excepto para el PFPeA;</li> <li>ii) <math>\pm 2.5\%</math> <math>t_R</math> del analito en la muestra con respecto al patrón;</li> <li>iii) Abundancia relativa del ión de confirmación debe ser <math>&lt; 20\%</math> de la media obtenida de los patrones de la curva;</li> <li>iv) S/N de los iones diagnóstico debe ser <math>&gt; 3</math>.</li> </ul>

En cuanto a los protocolos de aseguramiento de la calidad, se incluían en cada secuencia de muestras: blanco de reactivos, blanco de muestra y

blanco de muestra fortificado. Además, se evitó el uso de cualquier material sospechoso de contener fluoropolímeros, como botellas o tapones de teflón, vasos de teflón como los del MAE, etc. para eliminar cualquier posible contaminación durante el proceso.

Validación y protocolo de control de calidad para PBDEs en filtros PM2.5 del aire

La validación se llevó a cabo usando muestras de filtros PM2.5 de campo, blancas, fortificadas. La muestra blanca consistía en un filtro expuesto 24 h y sometido, posteriormente, a 300 °C durante 24 h para eliminar así cualquier posible presencia de PBDEs. Las adiciones a los blancos de muestra fortificados se realizaban con diferentes disoluciones de trabajo (según nivel de adición) que contenían los 12 PBDEs estudiados, y se dejaban toda la noche para asegurar la interacción de los analitos con la matriz.

En la **Tabla 4** se indican los parámetros estudiados en la validación del método, la manera en que han sido evaluados dichos parámetros y los resultados obtenidos para cada uno de ellos.

**Tabla 4.** Parámetros validados, cómo han sido evaluados y resultados de la validación de los PBDEs.

Parámetros estudiados en la validación	Realización	Resultados
<b>Linealidad</b>	Curva de calibración con matriz extraída y con patrones internos, de 5 puntos por triplicado ( $R^2$ y desviaciones residuales individuales).	5 puntos de curva de 0.3 a 10 ng/mL → $R^2 > 0.99$ y Residuales < 20%, en todos los casos.
<b>Exactitud (recuperación)</b>	Análisis de muestras de campo blancas fortificadas a 2 niveles de concentración, al LOQ y al nivel alto de la curva de calibración. Las secuencias analíticas fueron de 3 días y 3 réplicas a cada uno de los niveles cada día.	Las recuperaciones relativas medias (n=9 en cada nivel) fueron desde el 80% (BDE-66, al LOQ) al 106% (BDE-28 al LOQ y BDE-183 al nivel alto). Niveles validados fueron: el nivel del LOQ que oscila entre 0.063 pg/m <sup>3</sup> y 0.210 pg/m <sup>3</sup> y el nivel alto de la curva de calibración, 2.104 pg/m <sup>3</sup> .
<b>Precisión (reproducibilidad)</b>	Análisis de muestras de campo blancas fortificadas a 2 niveles de concentración. Las secuencias analíticas fueron de 3 días y 3 réplicas a cada uno de los niveles cada día.	Las desviaciones estándar relativas fueron en todos los casos menores al 18% (BDE-47 al LOQ).

<b>Especificidad</b>	Evaluar la ausencia de interferencias al mismo tiempo de retención que cualquiera de los PBDEs estudiados.	Se comprueba la ausencia de interferencias para cada uno de los analitos mediante el análisis de blancos de muestra.
<b>Límite de cuantificación (LoQ)</b>	Establecido como el nivel más bajo validado en el que se obtienen valores de recuperación y de precisión satisfactorios (80 - 120% y < 20%).	LOQ = 0.063 pg/m <sup>3</sup> para BDE_28, BDE-49, BDE-47, BDE-66, BDE-100. LOQ = 0.105 pg/m <sup>3</sup> para BDE-119 y BDE-99. LOQ = 0.210 pg/m <sup>3</sup> para BDE-155, BDE-154, BDE-153, BDE-139 y BDE-183. Recuperaciones = 80% - 106%. RSDs = 5 - 18%.
<b>Identificación y confirmación</b>	Cumplir con los criterios de confirmación establecidos en la Decisión de la Comisión 657/2002/CE.	i) 2 transiciones por analito, en nuestro caso 3, 1 de cuantificación y 2 de confirmación;  ii) ± 0.5% t <sub>R</sub> del analito en la muestra con respecto al del patrón;  iii) Abundancia relativa del ión de confirmación debe ser entre 20 - 50% de la media obtenida de los patrones de la curva;  iv) S/N de los iones diagnóstico debe ser > 3.

Cada secuencia de muestras fue analizada siguiendo los protocolos de aseguramiento de la calidad, en los cuales se incluían: blanco de reactivos, blanco de muestra y blanco de muestra fortificado.

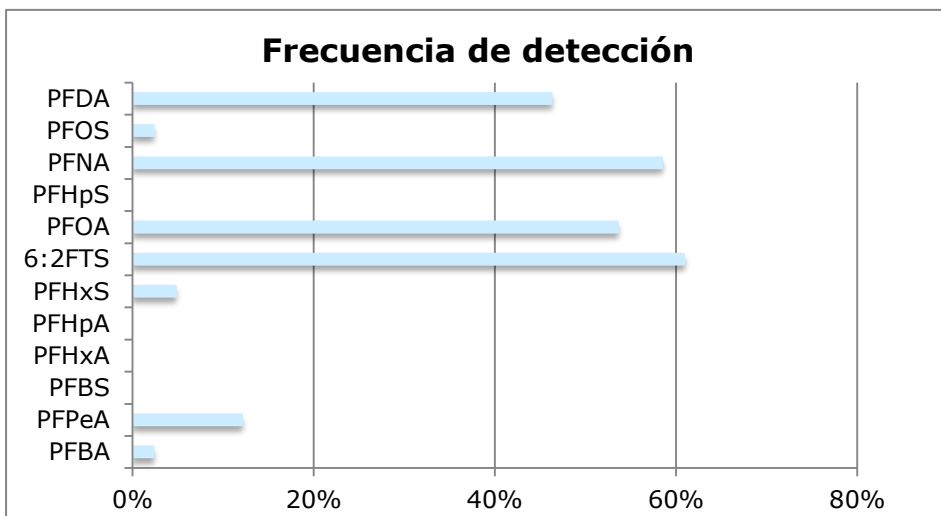
Análisis de muestras de campo para la determinación de PFAS

Para dar soporte a la aplicabilidad de la metodología desarrollada y validada, se realizó el análisis de muestras de campo. Así pues, se llevó a cabo la determinación de PFAS en 41 muestras de filtros PM2.5, recogidas desde abril a julio de 2010, en cinco estaciones distintas:

- 1) Zona residencial (parque de bomberos, P.B) en Elche (Alicante).
- 2) Zona industrial (P.A) en Elche también (Alicante).
- 3) Zona residencial (El Pla) en Alicante.
- 4) Zona rural en Pinoso (Alicante).
- 5) Zona residencial en Alcoy (Alicante).

Los resultados obtenidos mostraron que el analito detectado más frecuentemente fue el 6:2FTS (61%), seguido por el PFNA (59%) y PFOA

(54%) con concentraciones entre 1.4 – 34.3 pg/m<sup>3</sup>, 1.4 – 11.8 pg/m<sup>3</sup>, y 1.4 – 13.8 pg/m<sup>3</sup>, respectivamente, tal y como se puede apreciar en la **Figura 13**, en la que se indican las frecuencias de detección de cada analito.

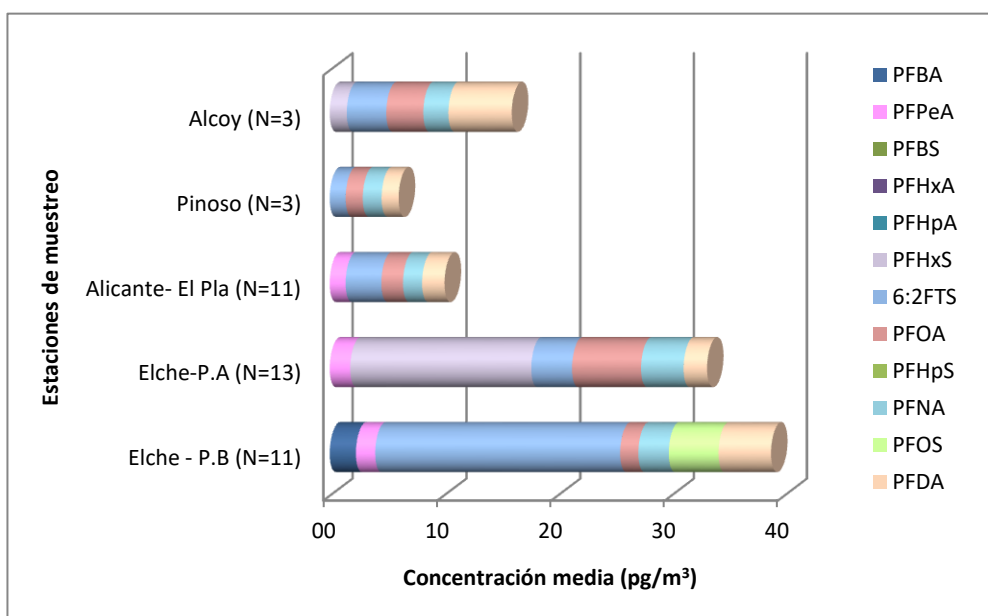


**Figura 13.** Frecuencias de detección de cada analito en las 41 muestras analizadas.

En la **Figura 14** se muestra la media de las concentraciones obtenidas para cada analito realizada únicamente de los resultados mayores al MQL y clasificadas por estaciones de muestreo. Como se puede apreciar, la zona en la que se encontró un ΣPFAS mayor, fue en Elche (P.B) seguida de la zona P.A en Elche también. Los resultados obtenidos fueron comparables a los obtenidos por Barber et al. (Barber et al. 2007), en el que el PFOA fue el detectado más frecuentemente, ya que en nuestro caso fue uno de los más detectados. De igual modo, las concentraciones obtenidas por Dreyer y Ebinghaus para el PFOA en un estudio realizado en Alemania oscilaban entre 1.9 y 6.1 pg/m<sup>3</sup>, siendo por tanto, del mismo orden que en el presente estudio (Dreyer & Ebinghaus 2009).

Los niveles de PFOS encontrados, 1.4 – 4.4 pg/m<sup>3</sup>, están también en consonancia con los reportados en estudios previos, como por ejemplo en Grandes Lagos (2 – 7 pg/m<sup>3</sup>) (Boulanger et al. 2005), <1 – 7 pg/m<sup>3</sup> en Japón (Harada et al. 2006), 0.1 – 2.3 pg/m<sup>3</sup> en Alemania (Dreyer & Ebinghaus 2009) y <LoQ – 7 pg/m<sup>3</sup> en cuatro puntos de Europa (Barber et al. 2007).

Uno de los principales motivos para la detección de las PFAS en localizaciones remotas es el estudio sobre el transporte a largas distancias de las PFAS neutras, volátiles y “precursoras” en la atmósfera, seguida de la deposición y transformación en las especies iónicas menos volátiles. Sin embargo, como ya se ha comentado en la introducción del presente capítulo, el hecho de encontrar niveles de las PFAS iónicas, no-volátiles, en la atmósfera, hace pensar en la posibilidad de que se dé el transporte directo a largas distancias de estas sustancias en las partículas del aire desde su fuente de origen.



**Figura 14.** Concentraciones media de cada uno de los analitos en cada una de las cinco estaciones de muestreo.

Análisis de muestras de campo para la determinación de PBDEs

En este estudio, correspondiente al Artículo Científico 2, se comprobó también la aplicabilidad de la metodología desarrollada mediante el análisis de ocho muestras de campo, filtros PM2.5, recogidas usando un captador activo de gran volumen. Los filtros estuvieron expuestos durante 24h un volumen total, aproximado, de 720 m<sup>3</sup>. Las muestras fueron recogidas

durante la primavera y verano de 2012, en Elche (Alicante) en el punto de muestreo localizado en un parque de bomberos.

Los resultados obtenidos mostraron que algunos de los PBDEs, como el BDE-100, BDE-154, BDE-153 y BDE-183 se encontraron en concentraciones menores al LoQ en la mayoría de las muestras. Que, además, el BDE-47 y el BDE-99 fueron encontrados en todas las muestras, y cuantificados en 6 y 5, respectivamente, de las 8 analizadas. Las concentraciones iban de 0.063 pg/m<sup>3</sup> a 0.112 pg/m<sup>3</sup> para el BDE-47 y de 0.107 pg/m<sup>3</sup> a 0.212 pg/m<sup>3</sup> para el BDE-99. Estos resultados van en consonancia con otros estudios realizados en la costa Mediterránea o, incluso, en el norte de China, en los que el BDE-47 y el BDE-99 son también los congéneres más abundantes (Castro-Jiménez et al. 2011; Wang et al. 2012) con concentraciones del orden de las obtenidas en este estudio.

Con todo esto, podemos decir que se han desarrollado y validado dos metodologías sensibles y selectivas para la determinación de ciertos contaminantes emergentes, como son las PFAS y los PBDEs, en la fase particulada del aire (filtros PM2.5). Para la optimización y desarrollo de las mismas se han hecho uso de técnicas de extracción (MAE) y de determinación actuales, con las que se pretendía mejorar y simplificar las metodologías existentes. Las técnicas instrumentales utilizadas para cada uno de los estudios, LC-MS/MS para las PFAS y GC-MS/MS para los PBDEs, son adecuadas para el uso requerido, y que además aportan de una gran selectividad al método. Se ha hecho uso también de la optimización multivariante, la cual, mediante diseños experimentales, facilita en gran medida las etapas de optimización. Los métodos se han validado y se han aplicado a muestras de campo. Si bien es cierto que existe alguna limitación en la determinación de PBDEs, y es que este estudio no incluye al BDE-209, tan importante en esta familia de compuestos. Esto es debido a que el BDE-209 se degrada térmicamente con gran rapidez, por lo que se requiere de una columna cromatográfica corta (15 m). Posteriormente en el LSPV, se ha incluido este analito en la determinación de esta familia de contaminantes mediante el uso de este tipo de columnas cromatográficas para el análisis en muestras alimentarias y biológicas.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- Barber, J.L., Berger, U., Chaemfa, C., Huber, S., Jahnke, A., Temme, C. & Jones, K.C. (2007). *Analysis of per- and polyfluorinated alkyl substances in air samples from Northwest Europe*. Journal of Environmental Monitoring, 9, 530–541. doi:10.1039/b701417a.
- Boulanger, B., Peck, A.M., Schnoor, J.L. & Hornbuckle, K.C. (2005). *Mass budget of perfluorooctane surfactants in Lake Ontario*. Environmental Science and Technology, 39, 74–79. doi:10.1021/es049044o.
- Buck, R.C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J.M., Cousins, I.T., de Voogt, P., Jensen, A.A., Kannan, K., Mabury, S.A. & van Leeuwen, S.P.J. (2011). *Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: Terminology, classification, and origins*. Integrated Environmental Assessment and Management, 7 (4) 513–541. doi:10.1002/ieam.258.
- Castro-Jiménez, J., Mariani, G., Vives, I., Skejo, H., Umlauf, G., Zaldívar, J.M., Dueri, S., Messiaen, G. & Laugie, T. (2011). *Atmospheric concentrations, occurrence and deposition of persistent organic pollutants (POPs) in a Mediterranean coastal site (Etang de Thau, France)*. Environmental Pollution 159 (7) 1948–1956. doi:10.1016/j.envpol.2011.03.012.
- Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities L221 (2002) pp 8-36.
- Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe. Official Journal of the European Union, L152 (2008) pp 1-44.
- Dreyer, A. & Ebinghaus, R. (2009). *Polyfluorinated compounds in ambient air from ship- and land-based measurements in northern Germany*. Atmospheric Environment, 43, 1527–1535. doi:10.1016/j.atmosenv.2008.11.047.
- European Commission, 2010. *Commission staff working document: Progress Report on the Implementation of the "European Environment and Health Action Plan 2004 - 2010"*. SEC(2010)387, Brussels.



- Harada, K., Nakanishi, S., Sasaki, K., Furuyama, K., Nakayama S., Saito, N., Yamakawa, K. & Koizumi, A. (2006). *Particle size distribution and respiratory deposition estimates of airborne perfluorooctanoate and perfluorooctanesulfonate in Kyoto Area, Japan*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 76, 306–310. doi:10.1007/s00128-006-0922-1.
- Interstate Technology and Regulatory Council (ITRC) (2017). *Nomenclatura y propiedades químicas y físicas de las sustancias per-y polifluoroalquiladas (PFAS)*. Washington, DC.
- OECD. 2013. *Synthesis paper on per- and polyfluorinated chemicals (PFCs)*. OECD/UNEP Global PFC Group. Environment, Health and Safety, Environment Directorate, OECD. Paris.
- Sanchez-Prado, L., Garcia-Jares, C., Dagnac, T. & Llompart, M. (2015). *Microwave-assisted extraction of emerging pollutants in environmental and biological samples before chromatographic determination*. Trends in Analytical Chemistry, 71, 119–143. doi:10.1016/j.trac.2015.03.014.
- Riu, A., Zalko, D. & Debrauwer, L. (2006). *Study of polybrominated diphenyl ethers using both positive and negative atmospheric pressure photoionization and tandem mass spectrometry*. Rapid communication in mass spectrometry, 20, 2133-2142. doi: 10.1002/rcm.2557.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (2010). *An exposure assessment of polybrominated diphenyl ethers*. National Center for Environmental Assessment, Washington, DC. EPA/600/R-08/086F. <http://www.epa.gov/ncea>.
- Wang, C., Li, W., Chen, J., Wang, H., Li, T., Shen, G., Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Wang, B., Zhang, Y., Tang, J., Liu, W., Wang, X. & Tao, S. (2012). *Summer atmospheric polybrominated diphenyl ethers in urban and rural areas of northern China*. Environmental Pollution, 171, 234–240. doi: 10.1016/j.envpol.2012.07.041.
- Wong, F., Shoeib, M., Katsoyiannis, A., Eckhardt, S., Stohl, A., Bohlin-Nizzetto, P., Li, H., Fellin, P., Su, Y. & Hung, H. (2018). *Assessing temporal trends and source regions of per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) in air under the Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP)*.

Atmospheric Environment, 172, 65–73. doi:10.1016/j.atmosenv.2017.10.028.

World Health Organization (WHO) (2018). *Calidad del aire y salud*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health). Fecha de acceso 08/01/2019.

Yao, Y., Chang, S., Zhao, Y., Tang, J., Sun, H. & Xie, Z. (2017). *Per- and poly-fluoroalkyl substances (PFASs) in the urban, industrial, and background atmosphere of Northeastern China coast around the Bohai Sea: Occurrence, partitioning, and seasonal variation*. Atmospheric Environment, 167, 150–158. doi:10.1016/j.atmosenv.2017.08.023.

Yeung, L.W.Y., Dassuncao, C., Mabury, S., Sunderland, E.M., Zhang, X.M. & Lohmann, R. (2017). *Vertical profiles, sources, and transport of PFASs in the Arctic Ocean*. Environmental Science & Technology, 51, 6735–6744. doi:10.1021/acs.est.7b00788.

**CAPÍTULO 3**  
**UTILIZACIÓN DE LA ESPECTOMETRÍA**  
**DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN**  
**PARA LA DETERMINACIÓN DE**  
**PFAS Y OP<sub>3</sub> EN LECHE MATERNA**





### **CAPÍTULO 3. UTILIZACIÓN DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PFAS Y OPs EN LECHE MATERNA.**

---

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	179
2. <u>ARTÍCULO CIENTÍFICO 3</u>	183
<i>Determination of 21 perfluoroalkyl substances and organophosphorus compounds in breast milk by Liquid Chromatography coupled to Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry</i>	
3. <u>DISCUSIÓN</u>	217
4. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	228

---



## 1. INTRODUCCIÓN

La leche materna es la fuente de alimentación universal y preferida para los recién nacidos. Es bien sabido que los beneficios son numerosos e incluyen, además de aspectos inmunológicos, también psicológicos, económicos, prácticos, ecológicos y nutricionalmente superiores (Erick 2018). De hecho la Organización Mundial de la Salud (WHO) recomienda la lactancia materna como alimentación exclusiva durante los primeros 6 meses de vida y como alimentación complementaria hasta los 2 años de edad. Sin embargo, hoy en día, la composición de la leche materna no es exclusivamente nutricional ya que actualmente puede contener una serie de sustancias tóxicas externas procedentes de la contaminación ambiental, alimentaria, etc. que a través de la exposición de la madre pueden acumularse en la misma (Picone & Paolillo 2013).

Como ya se ha comentado en la *Introducción General* de la presente **Tesis Doctoral**, el análisis de leche materna, genera información valiosa y muy variada:

- Se trata de una matriz excelente no invasiva para monitorizar la excreción de sustancias químicas y sus metabolitos, y poder así, realizar una evaluación de la exposición interna.
- Mediante el análisis de la leche materna, se puede evaluar, también, la cantidad de sustancias no deseadas, como los contaminantes emergentes, que son transferidas al infante, y evaluar así, la exposición externa a los mismos.

La leche materna presenta una gran variabilidad en cuanto a su contenido

en proteínas, grasas, carbohidratos, que a su vez depende de distintas características de la madre (edad, mes de lactancia, etc). Por ejemplo, en los primeros meses de lactancia el contenido de grasa es menor que al final de la misma (Lopes et al. 2016). Todo ello hace más complicado el análisis de esta matriz compleja.

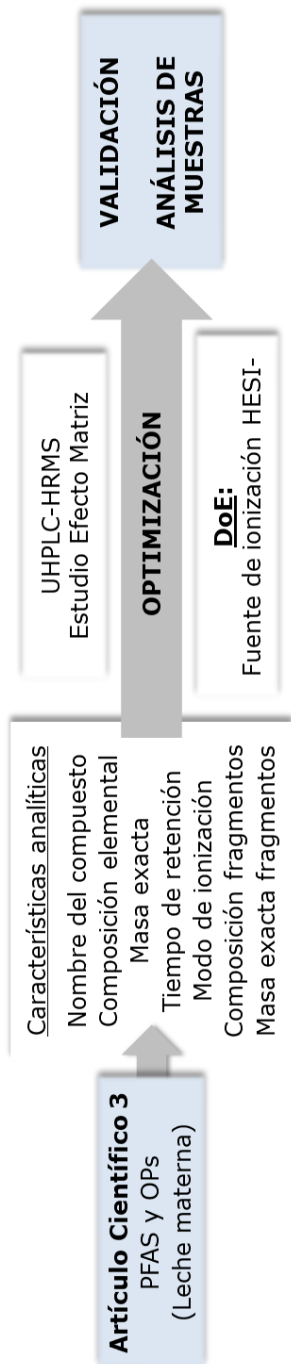
Entre los contaminantes emergentes las PFAS y los OPs son considerados sustancias de especial relevancia por su amplia utilización en materiales de uso cotidiano, por las características de cada familia de sustancias, y por su prevalencia generalizada en el medio ambiente. Por tanto es importante el desarrollo de nuevas metodologías analíticas para la determinación de sustancias como las PFAS y los OPs en leche materna.

Como también se ha comentado previamente, tanto en el *Capítulo 1* como en el *Capítulo 2* de la presente **Tesis Doctoral**, para el análisis de las PFAS se hace uso exclusivamente de la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas. Sin embargo, para la determinación de los OPs se utiliza indistintamente la cromatografía de gases y la de líquidos, ambas acopladas a la espectrometría de masas. Teniendo esto en cuenta, en el presente estudio se ha desarrollado una metodología que engloba la determinación simultánea de dos familias de sustancias diferentes mediante cromatografía líquida, pero además, se incorpora el uso de una técnica novedosa y avanzada como es la alta resolución utilizando un analizador orbitrap en la detección de contaminantes emergentes. Un sistema analítico como es el UHPLC-HRMS con analizador Orbitrap presenta grandes ventajas en el análisis multi-residuo / multi-analito. El uso del modo de adquisición de barrido completo con elevada sensibilidad, junto con la alta resolución (50000 FWHM) y la medida de la relación masa carga ( $m/z$ ) con un error inferior a 5 ppm, ofrece la posibilidad de llevar a cabo tanto análisis dirigidos como no dirigidos. Estas características hacen que esta técnica sea considerada como una poderosa alternativa a la más habitual de espectrometría de masas en tándem. Para hacer un uso amplio de esta opción se requiere de una metodología de extracción de amplio espectro, como es la metodología QuEChERS, la cual presenta grandes ventajas como es el uso reducido de disolventes, además de la disminución del tiempo invertido en el análisis, y la posibilidad de incluir en el método diferentes tipos de sustancias con gran variedad de polaridades.



Por todo ello, la metodología ha sido optimizada siguiendo estrategias de “paso a paso”, para algunas de las etapas, y haciendo uso del diseño experimental para la optimización de los parámetros de la fuente de ionización, en la cual los parámetros interaccionan unos con otros y se requiere de un mayor número de experimentos.

La estrategia seguida en el presente estudio se muestra en la **Figura 15**.



**Figura 15.** Estrategia seguida para el desarrollo y validación del Artículo Científico 3.

2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 3

Analytica Chimica Acta 1049 (2019) 123–132



Contents lists available at ScienceDirect  
**Analytica Chimica Acta**  
 journal homepage: [www.elsevier.com/locate/aca](http://www.elsevier.com/locate/aca)



Determination of 21 perfluoroalkyl substances and organophosphorus compounds in breast milk by liquid chromatography coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry



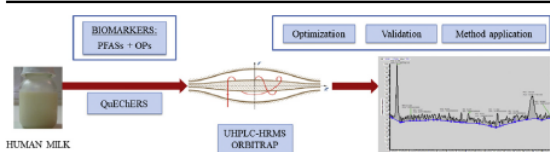
Maria Isabel Beser<sup>a</sup>, Olga Pardo<sup>b, c</sup>, Joaquim Beltrán<sup>d</sup>, Vicent Yusà<sup>a, b, c, \*</sup>

<sup>a</sup> Public Health Laboratory of Valencia, Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain  
<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Doctor Moliner 50, 46100, Burjassot, Spain  
<sup>c</sup> Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region, FISABIO-Public Health, 21, Avenida Catalunya, Valencia, 46020, Spain  
<sup>d</sup> Research Institute for Pesticides and Water, Avda Sos Baynat s/n, University Jaume I, 12071 Castellón, Spain

HIGHLIGHTS

- A new quantitative method to analyze PFASs and OPs in breast milk has been developed.
- The analytical method includes QuEChERS extraction and LC-HRMS.
- Matrix-matched calibration using internal standards in order to correct matrix effect.
- Validation parameters were assessed using fortified human milk blank samples.
- The developed method has been applied to SRM1954 and to 20 field samples.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:  
 Received 29 April 2018  
 Received in revised form 9 October 2018  
 Accepted 13 October 2018  
 Available online 17 October 2018

Keywords:  
 Perfluoroalkyl substances  
 Organophosphorus flame retardants  
 Breast milk  
 Biomonitoring  
 High resolution mass spectrometry  
 Dispersive solid phase extraction

ABSTRACT

The human exposure to perfluoroalkyl (PFASs) and organophosphorus (OPs) compounds is a cause of concern and its determination in biological matrices, including human milk, is an emergent approach for evaluate their exposure. A comprehensive strategy for the quantitative determination of 21 PFASs and OPs compounds in breast milk was developed. The proposed method includes an extraction and clean-up procedure based on the QuEChERS methodology followed by an ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) determination. The full-scan mass data were acquired with a resolution of 50000 FWHM and a mass accuracy better than 5 ppm. Method validation was performed in terms of recovery, repeatability, linearity and limit of quantification. The obtained recoveries varied between 70 and 120% with a precision (RSD) lower than 25%. The limit of quantification (LOQ) ranged between 1.9 and 19.0 ng g<sup>-1</sup> lipid weight for OPs, and between 0.066 ng mL<sup>-1</sup> and 0.666 ng mL<sup>-1</sup> for PFASs. A breast milk reference material was used in order to check the validated method. The developed analytical strategy was applied to 20 breast milk samples collected from mothers living in the Valencian Region (Spain). All of the OPs analyzed except tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) were detected in at least one sample. In all samples, perfluoro-n-pentanoic acid (PFPeA), perfluoro-n-octanoic acid (PFOA) and sodium perfluoro-1-octanesulfonate (PFOS) were the most frequently detected analytes.

\* Corresponding author. Generalitat Valenciana, Public Health Department, Avenida Catalunya, 21, 46020 Valencia, Spain. E-mail address: [yusa\\_vic@gva.es](mailto:yusa_vic@gva.es) (V. Yusà).

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.033>  
 0003-2670/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.



*Analytica Chimica Acta, 1049 (2019) 123-132*

**Determination of 21 perfluoroalkyl substances and organophosphorus compounds in breast milk by liquid chromatography coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry**

Maria Isabel Beser<sup>a</sup>, Olga Pardo<sup>b,c</sup>, Joaquim Beltrán<sup>d</sup>, Vicent Yusa<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Public Health Laboratory of Valencia, Av. Catalunya, 21, 46020, Valencia, Spain

<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, University of Valencia, Doctor Moliner 50, 46100, Burjassot, Spain

<sup>c</sup> Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research in the Valencian Region, FISABIO-Public Health, 21,

Avenida Catalunya, Valencia, 46020, Spain

<sup>d</sup> Research Institute for Pesticides and Water, Avda Sos Baynat s/n, University Jaume I, 12071 Castellón, Spain

---

**ABSTRACT**

The human exposure to Perfluoroalkyl (PFASs) and organophosphorus (OPs) compounds is a cause of concern and its determination in biological matrices, including human milk, is an emergent approach for evaluate their exposure. A comprehensive strategy for the quantitative determination of 21 PFASs and OPs compounds in breast milk was developed. The proposed method includes an extraction and clean-up procedure based on the QuEChERS methodology followed by an ultra-high performance liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS) determination. The full-scan mass data were acquired with a resolution of 50000 FWHM and a mass accuracy better than 5 ppm.

Method validation was performed in terms of recovery, repeatability, linearity and limit of quantification. The obtained recoveries varied between 70 and 120% with a precision (RSD) lower than 25%. The limit of quantification (LOQ) ranged between 1.9 and 19.0 ng g<sup>-1</sup> lipid weight for OPs, and between 0.066 ng mL<sup>-1</sup> and 0.666 ng mL<sup>-1</sup> for PFASs. A breast milk reference material was used in order to check the validated method.

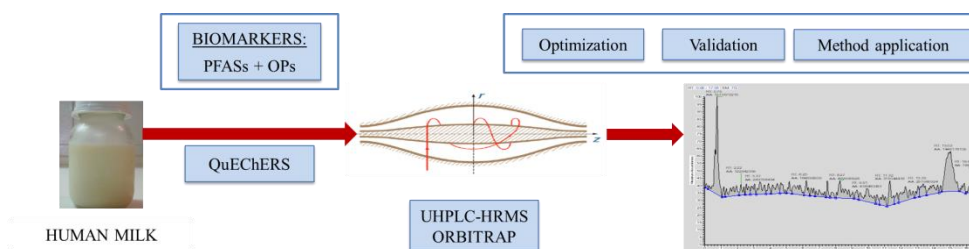
The developed analytical strategy was applied to 20 breast milk samples collected from mothers living in the Valencian Region (Spain). All of the OPs analyzed except tris(2-chloroethyl) phosphate (TCEP) were detected in at least one sample. In all samples, perfluoro-n-pentanoic acid (PFPeA), perfluoro-n-

octanoic acid (PFOA) and sodium perfluoro-1-octanesulfonate (PFOS) were the most frequently detected analytes. Concentration of total OPs ( $\Sigma$ OPs) and total PFASs ( $\Sigma$ PFASs) ranged from 1.9 to 37.7 ng g<sup>-1</sup> lipid weight and from 0.066 to 0.356 ng mL<sup>-1</sup>, respectively.

## HIGHLIGHTS

- A new quantitative method to analyze PFASs and OPs in breast milk has been developed.
- The analytical method includes QuEChERS extraction and LC-HRMS.
- Matrix-matched calibration using internal standards in order to correct matrix effect.
- Validation parameters were assessed using fortified human milk blank samples.
- The developed method has been applied to SRM1954 and to 20 field samples.

## GRAPHICAL ABSTRACT



**Keywords:** Perfluoroalkyl substances; Organophosphorus flame retardants; Breast milk; Biomonitoring; High resolution mass spectrometry; dispersive solid phase extraction.

## 1. Introduction

Human exposure to organic pollutants is one of the main concerns in the field of public health [1]. The continuous industrial development has led to the increasing production of various types of chemicals and their subsequent release into the environment. The direct consequence is the human exposure to these

environmental contaminants through inhalation of contaminated indoor/outdoor air, or ingestion of food, drinking water or dust [2]. In recent years, special attention has been drawn to biomarkers of exposure in biological matrices such as urine, plasma or breast milk to assess the body burden of these types of environmental pollutants. The term exposome is commonly used to refer to the entire environmental exposure in all stages of life, and it has been pointed out that it undoubtedly plays a key role in the development of chronic diseases [3]. Preferential attention requires the quality and health of the breast milk, because it is the natural and high quality food for infants during the first six months of life, since it has the optimal composition to meet their nutritional needs and provides immunological and physiological benefits [4].

Between the emergent pollutants, perfluoroalkyl substances (PFASs) or organophosphorus compounds (OPs) are of especial concern and relevance. The PFASs present unique characteristics, such as chemical inertness, stability and amphiphilic properties. Consequently, they have been widely used in consumer products, such as food packaging, nonstick pan coatings, fire extinguishers, textiles and paper [5,6]. Some PFASs are well-known persistent organic pollutants (POPs) due to their persistency and bioaccumulation properties. This characteristic, together with their potential for long-range environmental transport brought about some restrictions and regulations. In fact, perfluoro-1-octanesulfonate (PFOS) was included in the Stockholm Convention list in 2009, and perfluoro-n-octanoic acid (PFOA) has recently been proposed for listing under the Convention [7,8]. In turn, some OPs, such as organophosphorus flame retardants (OPFRs), are renowned suitable substitutes for brominated flame retardants (BFRs), given the restrictions on BFR production and use. Therefore, OPs have extensively been used worldwide for several decades. Whereas halogenated organophosphorus compounds are frequently used as flame retardants, the non-halogenated OPs are primarily employed as plasticizers and in some cases, as flame retardant plasticizers (e.g. triphenyl phosphite, TPhP) [9,10]. While halogenated OPs have been shown to be fairly persistent in terms of biodegradation, the persistence of the non-halogenated OPs increases with increasing alkyl chain length [11,12]. Many of the PFASs and OPs are present in materials as additives that are easily released into different environmental compartments via volatilization, leaching and/or abrasion. Hence, a wide variety of consumer products and building materials might act as potential releasing

sources of these substances into the environment. Although many studies have been published on PFASs and OPs occurrence in environmental matrices [13–15], there is still lack of data on PFASs, and more especially on OPs, in biological matrices. In human biomonitoring studies, PFASs are mainly measured in serum and breast milk. These compounds are not lipophilic, but amphiphilic substances that bind easily to blood proteins, so their concentrations in serum are higher than in breast milk. However, taking into account that breast milk is the main source of exposure to environmental chemicals for breastfed infants, it is important to monitor their levels in human milk [16,17].

The information about the occurrence of environmental contaminants in human milk is still limited. For this reason, and due to the growing concern about the presence of environmental contaminants in biological matrices, knowing the exposure levels is a necessary task. To complete a comprehensive study about exposure levels in breast milk it is essential to develop appropriate analytical methods to support future biomonitoring studies. Thus, we reviewed the currently-used techniques in order to select the best option for contaminant analysis in breast milk. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry is the main technique used for the analysis of PFASs in both environmental and biological matrices [5,18]. In contrast, both gas and liquid chromatography coupled to mass spectrometry have been used in the determination of OPs in environmental and biological samples providing good sensitivity and selectivity [11,19–21]. However, to our knowledge, only two studies have been published, by J.W. Kim et al. and Sundkvist et al., on the occurrence of OPs in human milk [22,23]. Taking this into account and considering the possibility of determining PFASs and OPs with the same method, using liquid chromatography seems to be the best choice. Concerning MS detection, despite its high selectivity and sensitivity, LC-MS/MS (QqQ) presents the limitation that only target analytes can be detected without the possibility of future retrospective data analysis [24]. As a consequence, the use of chromatographic techniques coupled to high-resolution mass spectrometry (HRMS) seems to be a successful alternative for the determination of emerging contaminants [23–26]. The HRMS analyzers have been increasingly used in the last years for multiclass/multianalyte analysis. The use of the full-scan acquisition mode with high sensitivity, together with the high resolution (>50000 FWHM) and the accurate mass measurement (1–5 ppm), provide the possibility



to perform both target and post-target analysis. These advantages make this technology to be considered a powerful alternative analytical tool [27,28]. However, to benefit from these advantages an efficient and wide range extraction method need to be used. The QuEChERS procedure is an attractive and excellent choice for sample preparation for the determination of polar, middle polar, and nonpolar substances, and therefore it allows developing methods with a wide scope [29,30]. In fact, it has already been used as extraction method for PFASs in environmental and biological matrices [2,5,18]. Nevertheless, this procedure has not been applied to the determination of OPs in environmental or biological samples. Although many studies have analyzed OPs in environmental samples such as water, air, dust and sediments, mainly using solid-liquid extraction (sonication) and liquid-liquid extraction [10,11,31], there are very few studies that analyze them in biological matrices [21] and, to our knowledge, only two works studied their occurrence in human milk samples [22,23]. Although the current trend in food controls or biomonitoring programs is to integrate various contaminant groups into a single procedure, the review of the available scientific literature did not reveal an analytical method for PFASs and OPs in human milk.

Therefore, the aim of the present study is to develop, optimize and validate an analytical strategy for the determination of 21 substances, PFASs and OPs (flame retardants and plasticizers) (Table 1), in breast milk samples based on QuEChERS procedure and liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. Thus, providing a powerful tool and working strategy that should allow to obtain more data on these environmental contaminants in human milk and to complete the biomonitoring programs with exposure levels in this matrix.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Chemicals and Reagents**

All commercial standards of organophosphorus compounds (OPs) were of high purity (> 95%) and were supplied by Dr. Ehrenstorfer (Ausburg, Germany) and Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). Standards of perfluoroalkyl substances (PFASs) were obtained from Wellington Laboratories (Guelp, ON, Canada) as methanol solution at the nominal concentration of 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Table 1 lists the studied compounds with their acronyms.

Each commercial OP standard was weighed and dissolved in acetonitrile to obtain individual stock solutions at concentrations ranging between 2.0 and 4.0 mg mL<sup>-1</sup>. For PFASs, individual stock solutions were prepared by diluting the commercial standard solution with acetonitrile to obtain 5.0 µg mL<sup>-1</sup> of each compound. Isotopically-labelled internal standards (ILIS) of OPs were of high purity (> 99%) and were supplied by Sigma-Aldrich (Barcelona, Spain). ILIS of PFASs in methanol solution at a concentration of 50 µg mL<sup>-1</sup> were purchased from Wellington Laboratories (Guelp, ON, Canada) (Table 1).

A mix solution containing these isotopically-labelled internal standards (OPs and PFASs) at 1.0 µg mL<sup>-1</sup> was prepared by diluting individually-labelled standard solutions in acetonitrile. Five mix working-standard solutions containing OPs and PFASs were prepared in acetonitrile to prepare the matrix-matched calibration curve and the spiked samples for recovery calculations (working standard solution "1" to "5"). Each solution was stored in the freezer at -20 °C.

The SRM 1954 reference material (breast milk) for organic contaminants was supplied by NIST SRM (Gaithersburg, USA). Acetonitrile and methanol (both of LC-MS grade) were supplied by VWR Prolabo (Barcelona, Spain). Acetic acid (glacial) of Suprapur® quality and formic acid (98 - 100%) were obtained from Merck (KGaA, Darmstadt, Germany). Ultra-pure water produced with a Milli-Q Gradient system (Millipore, Bedford, USA) was used throughout the study.

QuEChERS Extract Pouches-EN method (salt packet containing 4 g MgSO<sub>4</sub>, 1 g NaCl), 50 mL polypropylene tubes and ceramic homogenizers for QuEChERS extraction and QuEChERS fatty dispersive-SPE EN kit, 15 mL polypropylene tube containing 150 mg PSA, 150 mg C<sub>18</sub> and 900 mg MgSO<sub>4</sub> were purchased from Agilent Technologies (Madrid, Spain).

Statistical data manipulation and numerical analysis of data resulting from experimental design were carried out by means of the statistical package MINITAB for Windows, Release 14 (Minitab Inc., Birmingham, UK).

**Table 1.** Mass list, used internal standard, elemental composition, retention time, fragments and accurate mass data.

Compound	Acronyms (used ILIS) <sup>a</sup>	Retention Time (min)	Elemental composition	Diagnostic ion	Theoretical m/z [Da]	Composition	Fragments <sup>b</sup> Exact mass
<b>ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS</b> <sup>b1</sup>							
trimethyl phosphate	TMP (1)	1.06	C <sub>3</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	141.03112	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub> P <sup>+</sup>	127.01547
triethyl phosphate	TEP (1)	2.71	C <sub>6</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	183.07807	H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> P <sup>+</sup>	98.98467
tris(2-chloroethyl) phosphate	TCEP	4.54	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	284.96116	H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> P <sup>+</sup>	98.98467
tri-isopropyl phosphate	TiPrP (1)	6.36	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>4</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	225.12502	H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> P <sup>+</sup>	98.98467
tri-n-propyl phosphate	TnPrP (1)	6.73	C <sub>9</sub> H <sub>21</sub> O <sub>4</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	225.12502	H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> P <sup>+</sup>	98.98467
tris(2-chloroisopropyl) phosphate	TCPP	6.80	C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>3</sub> O <sub>4</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	327.00811	H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> P <sup>+</sup>	98.98467
triphenyl phosphate	TPhP (2)	7.75	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	327.07807	C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> <sup>+</sup>	153.06988
tri-n-butyl phosphate	TnBP (1)	8.33	C <sub>12</sub> H <sub>27</sub> O <sub>4</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	267.17197	H <sub>4</sub> O <sub>4</sub> P <sup>+</sup>	98.98467
tris(2-butoxyethyl) phosphate	TBEP (2)	8.62	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> O <sub>4</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	399.25062	C <sub>6</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub> P <sup>+</sup>	199.07299
<b>PERFLUOROALKYL SUBSTANCES</b>							
perfluoro-n-pentanoic acid <sup>b2</sup>	PFPeA (3)	4.45	C <sub>5</sub> HF <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	262.97601	C <sub>4</sub> F <sub>9</sub> <sup>-</sup>	218.98618
potassium perfluoro-1-butanefulfonate <sup>b3</sup>	PFBS (3)	5.23	C <sub>4</sub> F <sub>9</sub> O <sub>3</sub> S	[M-H] <sup>-</sup>	298.94299	O <sub>3</sub> S <sup>-</sup>	79.95631
perfluoro-n-hexanoic acid <sup>b2</sup>	PFHxA (3)	6.22	C <sub>6</sub> HF <sub>11</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	312.97281	C <sub>5</sub> F <sub>11</sub> <sup>-</sup>	268.98298
perfluoro-n-heptanoic acid <sup>b2</sup>	PFHpA (3)	7.31	C <sub>7</sub> HF <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	362.96962	C <sub>6</sub> F <sub>13</sub> <sup>-</sup>	318.97979
sodium perfluoro-1-hexanesulfonate <sup>b3</sup>	PFHxS (3)	7.50	C <sub>6</sub> F <sub>13</sub> O <sub>3</sub> S	[M-H] <sup>-</sup>	398.93660	FO <sub>3</sub> S <sup>-</sup>	98.95475
perfluoro-n-octanoic acid <sup>b2</sup>	PFOA (4)	8.14	C <sub>8</sub> HF <sub>15</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	412.96643	C <sub>7</sub> F <sub>15</sub> <sup>-</sup>	368.97660
perfluoro-n-nonanoic acid <sup>b2</sup>	PFNA (5)	8.91	C <sub>9</sub> HF <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	462.96323	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> <sup>-</sup>	418.97340
Sodium perfluoro-1-octanesulfonate <sup>b3</sup>	PFOS (6)	9.02	C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> O <sub>3</sub> S	[M-H] <sup>-</sup>	498.93022	FO <sub>3</sub> S <sup>-</sup>	98.95475

perfluoro-n-decanoic acid <sup>b2</sup>	PFDA (5)	9.74	C <sub>10</sub> HF <sub>19</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	512.96004	C <sub>9</sub> F <sub>19</sub> <sup>-</sup>	468.97000
perfluoro-n-undecanoic acid <sup>b2</sup>	PFUDA (5)	10.54	C <sub>11</sub> HF <sub>21</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	562.95684	C <sub>10</sub> F <sub>21</sub> <sup>-</sup>	518.96702
sodium perfluoro-1-decanesulfonate <sup>b3</sup>	PFDS (6)	10.55	C <sub>10</sub> F <sub>21</sub> O <sub>3</sub> S	[M-H] <sup>-</sup>	598.92383	FO <sub>3</sub> S <sup>-</sup>	98.95577
perfluoro-n-dodecanoic acid <sup>b2</sup>	PFDoA (5)	11.33	C <sub>12</sub> HF <sub>23</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	612.95365	C <sub>11</sub> F <sub>23</sub> <sup>-</sup>	568.96382
<b>INTERNAL STANDARDS</b>							
[d15]-triethyl phosphate (1) <sup>b1</sup>	d15-TEP	2.58	C <sub>6</sub> D <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	198.17222	D <sub>4</sub> O <sub>4</sub> P <sup>+</sup>	102.00300
[d15]-triphenyl phosphate (2) <sup>b1</sup>	d15-TPhP	7.69	C <sub>18</sub> D <sub>15</sub> O <sub>4</sub> P	[M+H] <sup>+</sup>	342.17222	C <sub>12</sub> D <sub>9</sub> <sup>+</sup>	162.12367
perfluoro-n-[ <sup>13</sup> C <sub>5</sub> ]pentanoic acid (3) <sup>b2</sup>	M5PFPeA	4.45	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> HF <sub>9</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	267.99278	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> F <sub>9</sub> <sup>-</sup>	222.99959
perfluoro-n-[ <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ]octanoic acid (4) <sup>b2</sup>	M4PFOA	8.14	<sup>13</sup> C <sub>4</sub> <sup>12</sup> C <sub>4</sub> HF <sub>15</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	416.97984	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> <sup>12</sup> C <sub>4</sub> F <sub>15</sub> <sup>-</sup>	371.98666
perfluoro-n-[ <sup>13</sup> C <sub>9</sub> ]nonanoic acid (5) <sup>b2</sup>	M9PFNA	8.93	<sup>13</sup> C <sub>9</sub> HF <sub>17</sub> O <sub>2</sub>	[M-H] <sup>-</sup>	471.99343	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> <sup>-</sup>	427.00024
perfluoro-n-[ <sup>13</sup> C <sub>8</sub> ]octanesulfonate (6) <sup>b3</sup>	M8PFOS	9.02	<sup>13</sup> C <sub>8</sub> F <sub>17</sub> O <sub>3</sub> S	[M-H] <sup>-</sup>	506.95706	FO <sub>3</sub> S <sup>-</sup>	98.95475

<sup>a</sup> (1-6) Indicate the Isotopically-labelled internal standards (ILIS) used for quantification of each analyte.

<sup>b</sup> HCD-Energy used to obtain fragments.

<sup>b1</sup> HCD-Energy = 30 eV

<sup>b2</sup> HCD-Energy = 10 eV

<sup>b3</sup> HCD-Energy = 35 eV

## 2.2. Samples

Human milk samples (n = 20) were obtained during 2015 from 14 Spanish women living in the Valencian region (Spain). They were collected by mothers, in different stages after birth, in a glass container using a breast pump. Mothers were recruited by the perinatology group of the Health Research Institute La Fe in Valencia. The age of the participating mothers ranged between 30 and 39 years. Samples were stored in the household freezer (-20 °C) until they were transferred to the IBSP-CV BioBank and stored at -80 °C until their analysis. These 20 samples of human milk analyzed are part of an initial exploratory study which, in turn, it is included in a human biomonitoring research project (BETTERMILK).

The study and sampling protocol were approved by the Scientific Ethics Committee of the Valencian Research Centre for Public Health (FISABIO) of the Valencian Government (Dirección General de Salud Pública, DGSP) and the Biomedical Scientific Ethics Committee of the University and Polytechnic Hospital La Fe. All the participants gave informed consent after receiving the information about the study.

## 2.3. Sample preparation

After homogenization of each sample, fat content and others macronutrients were determined by the perinatology group of the Health Research Institute La Fe in Valencia. The analytical technique used was mid-infrared (mid-IR) transmission spectroscopy using a MIRIS HMA™ (MIRIS AB, Uppsala Sweden).

The analytical method described below has been developed and modified on the basis of a previous study for PFAS analysis carried out by Lankova et al. (Lankova et al. 2013). A sample of 10 mL of breast milk was transferred into a 50 mL polypropylene centrifuge tube. 68.8 µL of ILIS mix solution, 240 µL formic acid, and 10 mL acetonitrile were added to the sample and it was mixed by shaking for 1 min. 4 g anhydrous MgSO<sub>4</sub>, 1 g NaCl and 2 homogenizer ceramics were added and the tube was immediately vigorously shaken by hand for 20 seconds first and then, by placing it 1 min on vortex. Then, the mixture was centrifuged at 8000 rpm, 15 °C, for 10 min. The total acetonitrile layer was taken and transferred to a 15 mL polypropylene tube for the clean-up procedure, by using a QuEChERS fatty dispersive-SPE EN kit (150 mg PSA, 150 mg C<sub>18</sub> and 900 mg MgSO<sub>4</sub>). The mixture was shaken for 1 min and centrifuged for 15 min at

4500 rpm and 15 °C. 6 mL of the extract was transferred to a 10 mL polypropylene tube for evaporating under N<sub>2</sub> stream at 35 °C to a volume of 150 µL. 250 µL of milliQ water were added to obtain a final volume of 0.4 mL (60% water and 40% organic phase). The final extract was transferred to an eppendorf tube without filter to centrifuge at 13000 rpm and 4 °C during 10 min. The extract was carefully taken, rejecting impurities, and transferred to a chromatography vial.

To avoid contamination of blanks or of samples, prior to analysis, all of the laboratory material used was rinsed with acetonitrile.

#### **2.4. UHPLC-HRMS analysis**

The UHPLC-HRMS system consists on an Accela™ autosampler, and an Orbitrap mass spectrometer Exactive™ analyzer equipped with a Heated Electrospray Ionization probe (H-ESI II), both from Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany). Chromatographic separation was carried out with a Hypersil Gold column (100 x 2.1 mm, 1.9 µm) from Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany). The flow rate used was 300 µL min<sup>-1</sup> and the injection volume was 10 µL. The mobile phase consisted of (A) an 0.1% acetic-acid aqueous solution and (B) methanol:acetonitrile (80:20, v/v) containing 0.1% acetic acid. The gradient was as follows: 0 min (40% B) and held for 2 min. After that, solvent B increased linearly to 80% in 4 min, and to 100% in another 4 min and was kept for 3 min. Finally, solvent B changed to the initial percentage (40%) in 0.5 min and was maintained for 3.5 min to equilibrate the column before the next injection. The total run time was 17 min. Data acquisition and data processing were fulfilled with the ThermoScientific TraceFinder™ 3.2 software.

The HRMS system was operated at a resolution of 50,000 FWHM (scan rate 2 Hz) with a maximum injection time of 250 ms. The mass tolerance was set at 5 ppm and external mass calibration was performed. For the Automatic Gain Control, the "Balanced" setting was selected.

A statistical design of experiments (DoE) was used for the optimization of the most relevant parameters affecting ion source (León et al. 2016). The procedure is described in Electronic Supplementary Data. Optimized parameters of the ion source were: spray voltage (SV), 2.5 kV (negative mode) and 3.6 kV (positive mode); sheath gas pressure (SGP) (N<sub>2</sub>, > 95%), 50 (arbitrary units); auxiliary gas (AG), 10 (arbitrary units); skimmer voltage (SKV), 21 V (negative mode)

and 29 V (positive mode); capillary voltage (CV), 40 V; heater temperature (HT), 450 °C; and capillary temperature (CT), 100 °C.

For each sample two independent runs were necessary for complete data acquisition. One run in positive ionization mode (ESI+), included two alternating scan events with fragmentation (30 eV) and without fragmentation. The other run in negative ionization mode (ESI-) included three alternating scan events with fragmentation (10 eV)/(35 eV) and without fragmentation. The fragmentation took place in the high-energy collision dissociation cell (HCD) without selection of the parent ion ("All Ion Fragmentation"). An acquisition scan range of 50 - 900 m/z was set for all scan events. Elemental composition, retention time, fragments and accurate mass data of each compound are shown in Table 1.

## 2.5. Matrix effect evaluation

It is well known that in liquid chromatography coupled to mass spectrometry, the matrix effect is an important issue that must be addressed during method development and before studying its performance characteristics. Ion suppression and signal enhancement may be caused by different factors as reported by several authors [32,33].

The Matrix effect (ME%) of the method was evaluated by comparing the absolute peak areas of a standard solution containing the 21 analytes at a concentration of 50 ng mL<sup>-1</sup> in mobile phase (A, n=5) and a matrix-matched standard (prepared with blank extracts of human breast milk samples) at the same concentration than A for the 21 analytes (B, n=5).

The matrix effect was calculated via the formula:

$$ME (\%) = (B / A) * 100$$

Where, A and B are the mean peak areas of A and B, respectively.

## 2.6. Method performance characteristics

Analytical performance characteristics of the method, based on validation guidelines included in the EU Commission Decision 2002/657/EC [34], were evaluated. The validation parameters, included linearity, accuracy (measured as mean recovery), precision (reproducibility, in terms of Relative Standard Deviation, % RSD), and limit of quantification (LOQ), were assessed using

fortified human milk blank samples. Linearity of the method was evaluated by calculating the deviation (RSD < 20%) for each point of the calibration curve and the coefficient of determination ( $R^2 > 0.99$ ) of the linear regression equations of matrix-matched calibration curves obtained by spiking blank samples with the target analytes before extraction using the working standard solutions. Concentrations ranged between 1 and 150 ng mL<sup>-1</sup> (in vial) depending on the compound (5-point calibration). Accuracy and precision were determined by analyzing blank samples spiked at two different concentrations corresponding to the LOQ and intermediate level of the calibration curve. The LOQ was established as the lowest concentration of the calibration curve in which recovery and precision were satisfactory (recovery range: 70 - 120%, RSD < 25%). Likewise, in the LOQ the identification criteria are fulfilled. The method detection limit (MDL) was estimated as three times the signal to noise ratio in low-level spiked samples [35,36]. Furthermore, mass assignment < 5 ppm in all replicates was required. The analytical schedule was three days and three replicates each day, obtaining a number of data  $n = 9$  for each compound.

In order to ensure the method performance in each batch of field samples, a reagent blank and a procedural blank were included to test contamination and interferences. Also, two Quality Control (QC) samples at two concentration levels of the working range (LOQ and intermediate) were analyzed.

Furthermore, a reference material of breast milk, SRM 1954, was analyzed five times in different days. Concentrations of the SRM 1954 reference material were not certified values for PFASs, however, Keller et al. [37] established consensus values with six different laboratories for PFOA and PFOS. The quantification was performed with the area corresponding to the quasi-molecular ion of the analyte obtained in full-scan mode. To correct possible matrix effects and losses occurred during extraction, analogous and non-analogous ILIS were used, as shown in Table 1.

## **2.7. Confirmation criteria**

For identification and confirmation of target analytes by HRMS, three criteria were established on the basis of the SANTE/11813/2017 guideline [38]: Criterion 1: mass accuracy should be better than 5 ppm; Criterion 2: a tolerance of  $\pm 2.5\%$  for Relative Retention Time (RRT) is allowed between the suspicious analyte in the sample and the analyte in the quality control samples; Criterion 3:



The ratio of the fragment ions obtained by HCD (if they exist) relative to the quasi-molecular ion of the analyte in the sample should not differ more than 30% with respect to the value obtained in the quality control samples.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of instrumental parameters: Ion source-HRMS

For detection of the target analytes using Orbitrap-HRMS, a database was built comprising the elemental composition, polarity, monoisotopic accurate mass of each quasi-molecular ion, both in positive ( $[M+H]^+$ ) and negative ionization mode ( $[M-H]^-$ ), and fragments with their exact mass (Table 1). The strategy to find possible fragments was supported by a precise review of the literature and research of the corresponding fragmentation spectrum at the retention time of each molecule. To obtain appropriate fragments and taking into account that the compounds, especially PFASs, require different HCD-energies, we have used two HCD-energies (10 eV and 35 eV) (see Table 1).

When attempting to discover the most relevant parameters and then to improve analyte responses by optimizing ion source parameters, statistical design of experiments (DoE) seems to be the best choice for the optimization of source settings [39] (see Electronic Supplementary Data).

#### 3.2. Optimization of chromatographic separation

The compounds analyzed covered a wide range of polarities, from very polar substances, such as some of the short-chain perfluoroalkyl substances or some organophosphorus compounds like short alkyl phosphorus compounds (e.g. PFPeA, TMP), to non-polar ones such as aryl phosphate or long alkyl phosphorus compounds (e.g. TBEP). Different compositions were investigated for the mobile phase including acetonitrile or methanol as organic phase. Several modifiers were tested in both organic and aqueous phases. The tested modifiers were formic acid, acetic acid, ammonium acetate and ammonium formate. In the case of PFASs, there were no significant differences in signals when ammonium formate and formic acid were used. Despite that, signals were slightly higher when the modifiers were acetic acid or/and ammonium acetate. Regarding OPs, signals improved when acetic acid was used. This is because acetic acid is a weak acid modifier, so the presence of proton ions increases and improves positive

ionization. Nevertheless, the presence of ammonium acetate showed no signal improvement. Therefore, acetic acid was the best choice for both families, and it was selected as a modifier in the mobile phase. The percentage of methanol (from 20% to 95%) in the organic phase was also studied. No differences were found when increasing the methanol percentage in most analytes. However, higher responses were obtained when methanol was present at 80% for TMP, TnBP or TPhP. Therefore, the final mobile phase was: water with 0.1% acetic acid as solvent A, and methanol:acetonitrile (80:20, v/v) with 0.1% acetic acid as solvent B. The gradient used is described in the 2.4 section.

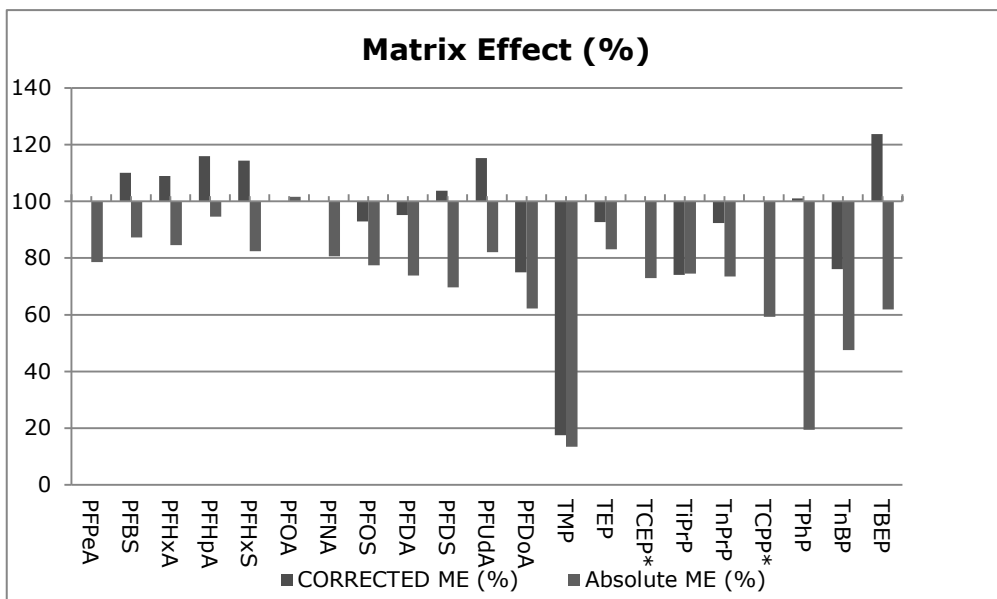
### 3.3. Matrix effect study

The matrix effect was classified into three different categories considering the calculated ME values [24]. There was no matrix effect when the ME factor was between 80% and 120%. A medium matrix effect was considered when the values ranged between 40% and 80% or 120% and 150%. A value below 40% or above 150% was classified as a high matrix effect.

As it can be seen in Figure 1, only medium matrix effect was detected for a few compounds in the case of PFASs (PFPeA 79%, PFDA 74%, PFDoA 62%, PFOS 77% and PFDS 70%). However, OPs showed a considerable matrix effect in the majority of compounds. Very high ion suppression was detected for TMP (13%) and TPhP (19%). In turn, medium matrix effect by ion suppression was detected for TCEP (73%), TiPrP (75%), TnPrP (74%), TCPP (59%), TnBP (47%) and TBEP (62%).

Matrix effect has been explained previously by Gosetti et al [33]. The reactions in gas phase give rise to loss of charge of the analyte ions; consequently, matrix effect by ion suppression may be produced. Related to ESI ionization, ion suppression may also be due to the presence of interfering compounds at high concentration, which may increase viscosity and surface tension of the droplets produced in ESI interface, facilitating the formation of adduct ions or ion pairs, therefore, reducing the ability of the analytes to reach the gas phase with a consequent decrease of ionization efficiency [33].

The choice of positive (PI) or negative ionization (NI) mode can affect the signal in different ways. Some authors show in their studies that when the species were ionized in NI modes, the signal suppression was not, generally, significant, in contrast with that observed in PI mode [40]. Maybe, this could account for the high matrix effect obtained for the OPs which are ionized in PI mode in contrast with PFASs which are ionized in NI mode. Ion suppression effects can be minimized or corrected by modifying the ionization conditions, the clean-up procedure, the chromatographic conditions and the calibration techniques (the latter used for correction).



**Absolute ME:** Absolute matrix effect was evaluated by comparing the absolute peak areas of five replicates of spiked samples after extraction and clean-up and five replicates of standard solutions at a concentration of 50 ng mL<sup>-1</sup> in mobile phase.

**Corrected ME:** Corrected matrix effect was evaluated by comparing the relative peak areas (peak area of analyte / peak area of isotope labelled internal standard) of the same spiked samples and standard solutions.

**Fig. 1.** Matrix Effect Study. Absolute matrix effect (%) and corrected matrix effect (%) using six isotopically-labelled internal standards.

OPs are not ionized in negative mode, so changing the ionization mode was discarded in this study. Other options, like additional clean-up steps, are time-consuming and involve more sample manipulation, which can increase the analytical errors associated to sample treatment and impair the future post-target analysis. Nevertheless, the chromatographic conditions used for this analysis were optimized taking into account this issue. Sample dilution might also

be a good option although it would reduce method sensitivity, so this possibility was directly discarded. The best solution seems to be the use of isotope labelled internal standards (ILIS) to correct analyte signal suppressions or enhancements resulting from matrix effects. The ideal situation occurs when each analyte is corrected by its own isotope-labelled molecule; however, the use of these ones is rather problematic when the multi-residuality of the method increases due to the commercial unavailability or to the economical restrictions. For these reasons, only a few labelled compounds were used for correction of matrix effects (6 labelled compounds were used out of 21 compounds determined). As a consequence, analytes were divided into several groups with the objective of performing corrections with the ILIS more appropriate (chemical similarity, closeness of retention time). As expected (see Figure 1, Corrected ME), satisfactory corrections were obtained when an isotope-labelled internal standard was applied. Despite that, the matrix effect for the TMP was not successfully corrected. Therefore, the combination of matrix-matched standard calibration and the use of ILIS was the best choice to correct the matrix effects for each compound.

### **3.4. Method performance characteristics**

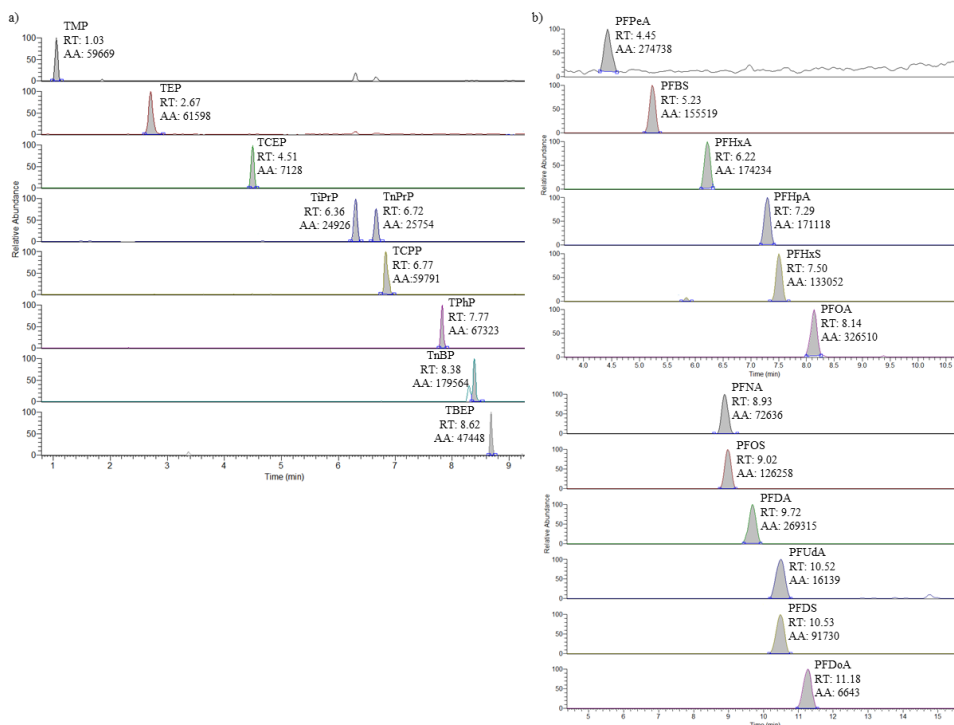
The performance characteristics of the validated method are summarized in Table 2. For all compounds,  $R^2 > 0.99$  and  $RSD \leq 20\%$  for each calibration point, was obtained. Adequate recoveries, for the two levels validated, were obtained for the target compounds ranging from 84% (PFHxS) to 110% (TMP and PFOA). Precision, as RSD (%), was  $\leq 25\%$  for the all analytes (Table 2). Nevertheless, some compounds showed values of precision close to 25%. This occurs in a few compounds, in which non-analogous ILIS were used, for example, in the case of TnBP and PFDoA with values of 23% and 24% of RSD at higher level. Precision of the method should be improved if analogous ILIS were used. As an example, a chromatogram of the compounds from a blank sample spiked at the limit of quantification is presented in Figure 2. Overall, MDLs obtained for PFASs ( $0.001 - 0.056 \text{ ng mL}^{-1}$ ) were comparable to others previously reported in human milk processed with similar determination techniques, such as Kadar et al [25], who used also a UHPLC-HRMS for the analysis of these compounds.

**Table 2.** Analytical performance of the method: Method detection limit (MDL), limit of quantification (LOQ), mean recoveries and precision at the two levels validated (n = 9).

Compounds	MDL	LOQ Level			Intermediate Level		
		Concentration <sup>1</sup>	Recoveries (%)	RSD (%)	Concentration	Recoveries (%)	RSD (%)
<b>ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS (Conc. in ng g<sup>-1</sup> lipid weight)</b>							
TMP	0.32	19.0	110	13	38.1	92	17
TEP	0.02	1.9	94	14	19.0	97	12
TCEP	1.02	9.5	94	21	19.0	89	14
TiPrP	0.06	1.9	109	7	19.0	106	11
TnPrP	0.04	1.9	103	19	19.0	102	10
TCPP	0.13	9.5	103	10	19.0	92	23
TPhP	0.12	9.5	108	13	19.0	102	11
TnBP	0.03	1.9	97	19	9.5	93	23
TBEP	0.03	1.9	104	15	9.5	110	17
<b>PERFLUOROALKYL SUBSTANCES (conc. in ng mL<sup>-1</sup>)</b>							
PFPeA	0.003	0.133	106	7	0.666	100	6
PFBS	0.001	0.066	108	6	0.666	91	9
PFHxA	0.005	0.066	104	12	0.333	91	23
PFHpA	0.007	0.066	105	9	0.333	90	15
PFHxS	0.004	0.133	95	12	0.666	84	12
PFOA	0.006	0.133	110	9	0.666	96	6
PFNA	0.008	0.066	105	14	0.666	92	7
PFOS	0.004	0.066	105	12	0.333	91	11
PFDA	0.024	0.333	97	21	0.666	93	17
PFUdA	0.016	0.333	94	16	1.666	87	20
PFDS	0.022	0.333	97	17	1.666	89	21
PFDoA	0.056	0.666	107	12	1.666	86	24

With regard to OPs, MDLs ranged from 0.02 to 1.02 ng g<sup>-1</sup> lipid weight, very few studies have been performed in breast milk and although Kim et al [22] obtained MDLs (0.01 – 0.08 ng g<sup>-1</sup> lipid weight) lower than MDLs obtained in the present study, our MDLs are comparable, or even better, to the reported by Sundkvist et al (0.02 – 3.7 ng g<sup>-1</sup> lipid weight) [23]. This is the price paid for combining two families of compounds with different properties. However, taking into account the occurrence of these compounds in human milk detected in other studies, the MDLs obtained are appropriate to determine the analytes and to know the frequency of occurrence in biomonitoring studies.

The validated method was applied to the SRM 1954 reference material. Although this material is not certified for PFASs, Keller et al. [37] established consensus values for PFOS and PFOA of  $0.16 \pm 0.03$  and  $0.13 \pm 0.04$  ng g<sup>-1</sup>, respectively. The main concentrations of the five replicates analyzed like samples were 0.14 ng g<sup>-1</sup> for PFOS (RSD = 11%) and 0.10 ng g<sup>-1</sup> for PFOA (RSD = 10%). These values were in accordance with those consensus values.



**Fig. 3.** Chromatogram (XIC) of the quasi-molecular ion for a) organophosphorus compounds and b) perfluoroalkyl substances, of a blank breast milk sample spiked at the limit of quantification. Mass extraction window of 5ppm.

### 3.5. Application to field samples

The applicability of the proposed method has been evaluated by analyzing 20 human milk samples. Table 3 summarizes the results obtained. In all samples, at least one analyte was found and the frequency of detection was as follows: PFPeA and PFOA appeared in 95% and 85% of the samples, respectively; PFOS (55%), TEP (45%), PFHxS (30%), TiPrP and TPhP (15%), TnPrP (10%), and TMP, TCPP, TnBP, TBEP, PFHpA and PFNA (5%). Concentrations ranged from 0.070 (PFNA) to 0.180 ng mL<sup>-1</sup> (PFOA) for PFASs and from 1.9 (TEP) to 19.0 ng g<sup>-1</sup> lipid weight (TMP) for OPs. Regarding PFASs, mean and median concentrations are comparable to other reported results [5,25,41]. For example,

M. Lorenzo et al. [41] reported average concentrations of PFOA and PFOS in breast milk of mothers living in Spain of  $0.177 \text{ ng mL}^{-1}$  (100%, frequency of occurrence) and  $0.050 \text{ ng mL}^{-1}$  (60%, frequency of occurrence), in accordance with our data. With regard to OPs, studies have not been performed in Spain, however, Sundkvist et al. [23] reported data for OPs in human milk in Sweden, which were higher than the results obtained in our samples from the Valencian region (Spain).

In order to obtain a very preliminary estimation of the exposure and risk of the lactating infants to the two more relevant compounds in our study (PFOA and PFOS), the daily intake was calculated and compared with the tolerable daily intakes (TDI). For this purpose, an infant human milk consumption of  $140 \text{ mL Kg}^{-1} \text{ b.w. - day}$  and an upper percentile value of  $190 \text{ mL Kg}^{-1} \text{ b.w. - day}$  for 1 - 3 months of age of breast-feedings was used [42]; and it was combined with the mean levels of PFOA ( $0.0152 \text{ ng mL}^{-1}$ ) and PFOS ( $0.066 \text{ ng mL}^{-1}$ ) obtained in this study. Therefore, the daily intake of these contaminants at two different scenarios (medium and higher intake) resulted in  $0.0021 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1} \text{ b.w. - day}$  and  $0.0029 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1} \text{ b.w. - day}$ , respectively, for PFOA; and for PFOS the daily intake resulted in  $0.0092 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1} \text{ b.w. - day}$  and  $0.01254 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1} \text{ b.w. - day}$ , respectively. Considering TDI values of  $1.5 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1} \text{ b.w. - day}$  for PFOA and  $0.15 \text{ } \mu\text{g Kg}^{-1} \text{ b.w. - day}$  for PFOS, it can be concluded that even with the worst scenario (higher intake) the daily intake of both analytes is much lower than their TDI, and consequently there is no risk.

Figure 3 shows the confirmation chromatogram and spectra of PFOA and TCPP in two field samples: Retention time, quasi-molecular ion measured (without fragmentation), the characteristic fragment obtained (with HCD), and the theoretical and experimental isotopic patterns.

**Table 3.** Concentrations obtained of OPs and PFASs in 20 human milk samples.

Compounds	Samples (n = 20)			
	n > MDL	Conc. Range <sup>a</sup>	Median <sup>b</sup>	Mean <sup>b</sup>
<b>ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS (Conc. in ng g<sup>-1</sup> lipid weigh)</b>				
TMP	1	n.d. – 19.0	19.0	19.0
TEP	9	n.d. – 7.8	3.4	4.0
TCEP	-	-	-	-
TiPrP	3	n.q	-	-
TnPrP	2	n.q	-	-
TCPP	1	n.d. – 12.5	12.5	12.5
TPhP	3	n.d – 17.3	9.9	12.3
TnBP	1	n.d. – 10.9	10.9	10.9
TBEP	1	n.d – 14.8	14.8	14.8
<b>PERFLUOROALKYL SUBSTANCES (conc. in ng mL<sup>-1</sup>)</b>				
PFPeA	19	n.d. – 0.176	0.158	0.158
PFBS	-	-	-	-
PFHxA	-	-	-	-
PFHpA	1	n.q	-	-
PFHxS	6	n.q	-	-
PFOA	17	n.d. – 0.180	0.138	0.152
PFNA	1	n.d. – 0.070	0.070	0.070
PFOS	11	n.d – 0.078	0.069	0.066
PFDA	-	-	-	-
PFUdA	-	-	-	-
PFDS	-	-	-	-
PFDoA	-	-	-	-

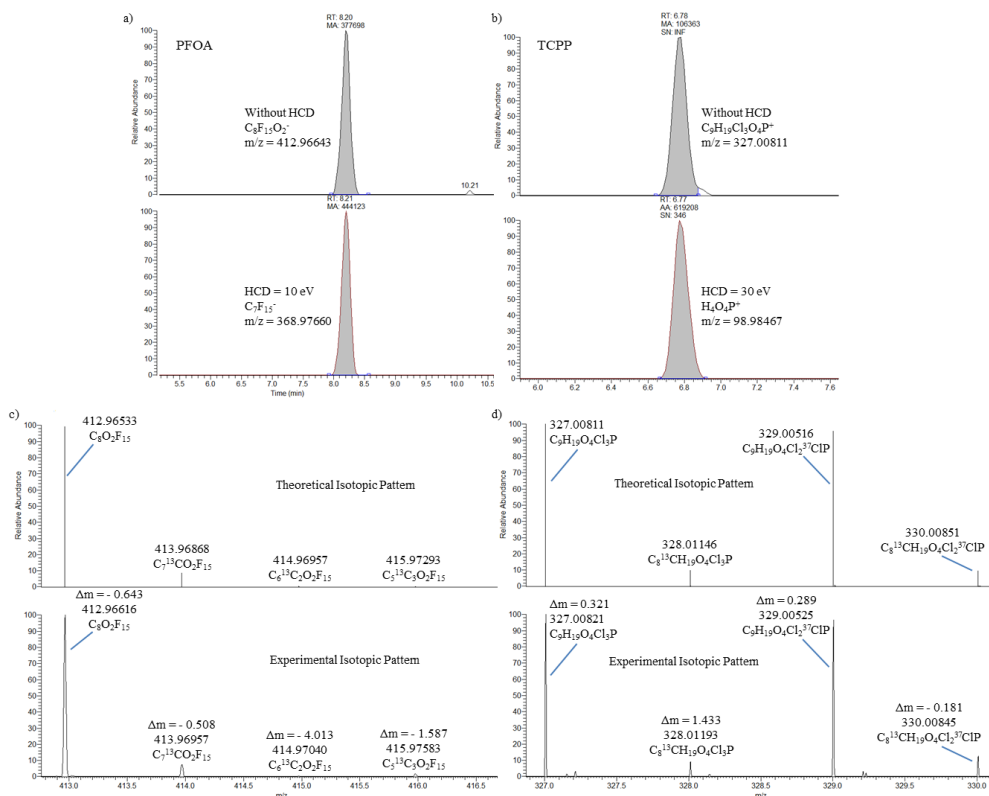
<sup>a</sup> When an analyte was detected but not quantitated, values are not indicated.

<sup>b</sup> Median and mean concentrations were calculated from values above LOQ.

n.d. Not detected.

n.q. Not quantitated.





**Fig. 3.** Confirmation workflow of two positive field samples for PFOA and TCPP: a) Extracted ion chromatograms of the quasi-molecular ion (without HCD fragmentation) and characteristic fragment of PFOA with HCD fragmentation at 10 eV, b) Extracted ion chromatograms of the quasi-molecular ion (without HCD fragmentation) and characteristic fragment of TCPP with HCD fragmentation at 30 eV, and c) Theoretical and experimental isotopic pattern of PFOA, and d) Theoretical and experimental isotopic pattern of TCPP.

#### 4. Conclusions

A quantitative and confirmatory method for the determination of 21 relevant PFASs and OPs in human milk samples, using UHPLC coupled to HRMS, has been developed and validated. The method presents appropriate performance parameters that permit their use in large human biomonitoring programs. We applied the developed methodology to 20 field samples, and three out of 21 compounds analyzed (PFPeA, PFOA and PFOS) presented detection frequencies higher than fifty percent. In a very preliminary estimation, no health risk for lactating infants was found related to the exposure to PFOA and PFOS.

## Acknowledgements

This work was developed under the financial support of the Consellería d'Educació (Generalitat Valenciana), Spain (GV/2015/008). The authors would like to thank the perinatology group of the Health Research Institute La Fe in Valencia for their work in selecting and collecting samples for this study.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found in the online version at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.033>.

## References

- [1] WHO. Global Environment Monitoring System, Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food), (2013). <http://www.who.int/foodsafety/chem/gems/en/index1.html>.
- [2] V. Hloušková, D. Lanková, K. Kalachová, P. Hrádková, J. Poustka, J. Hajšlová, J. Pulkrabová, Brominated flame retardants and perfluoroalkyl substances in sediments from the Czech aquatic ecosystem, *Sci. Total Environ.* 470–471 (2014) 407–416. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.074.
- [3] C.P. Wild, The exposome: from concept to utility, *Int. J. Epidemiol.* 41 (2012) 24–32. doi:10.1093/ije/dyr236.
- [4] N.J. Andreas, B. Kampmann, K. Mehring Le-Doare, Human breast milk: A review on its composition and bioactivity, *Early Hum. Dev.* 91 (2015) 629–635. doi:10.1016/J.EARLHUMDEV.2015.08.013.
- [5] D. Lankova, O. Lacina, J. Pulkrabova, J. Hajslova, The determination of perfluoroalkyl substances, brominated flame retardants and their metabolites in human breast milk and infant formula, *Talanta.* 117 (2013) 318–325. doi:10.1016/j.talanta.2013.08.040.
- [6] J. Forns, N. Iszatt, R.A.A. White, S. Mandal, A. Sabaredzovic, M. Lamoree, C. Thomsen, L.S.S. Haug, H. Stigum, M. Eggesbø, Perfluoroalkyl substances measured in breast milk and child neuropsychological development in a Norwegian birth cohort study, *Environ. Int.* 83 (2015) 176–182. doi:10.1016/j.envint.2015.06.013.

- [7] European Food Safety Authority, Perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctanoic acid (PFOA) and their salts Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain 1 (Question No EFSA-Q-2004-163) PANEL MEMBERS, *EFSA J.* 653 (2008) 1–131.
- [8] UNEP Stockholm Convention, SC-4 / 17: Listing of perfluorooctane sulfonic acid, its salts and perfluorooctane sulfonyl fluoride, (2009).
- [9] I. Liagkouridis, A.P. Cousins, I.T. Cousins, Physical-chemical properties and evaluative fate modelling of 'emerging' and 'novel' brominated and organophosphorus flame retardants in the indoor and outdoor environment, *Sci. Total Environ.* 524–525 (2015) 416–426. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.02.106.
- [10] N. Van den Eede, A.C. Dirtu, H. Neels, A. Covaci, Analytical developments and preliminary assessment of human exposure to organophosphate flame retardants from indoor dust, *Environ. Int.* 37 (2011) 454–461. doi:10.1016/j.envint.2010.11.010.
- [11] A. Möller, Z. Xie, A. Caba, R. Sturm, R. Ebinghaus, Organophosphorus flame retardants and plasticizers in the atmosphere of the North Sea, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 3660–3665. doi:10.1016/j.envpol.2011.07.022.
- [12] G.-L. Wei, D.-Q. Li, M.-N. Zhuo, Y.-S. Liao, Z.-Y. Xie, T.-L. Guo, J.-J. Li, S.-Y. Zhang, Z.-Q. Liang, Organophosphorus flame retardants and plasticizers: sources, occurrence, toxicity and human exposure, *Environ. Pollut.* 196 (2015) 29–46. doi:10.1016/j.envpol.2014.09.012.
- [13] T. Reemtsma, M. García-López, I. Rodríguez, J.B. Quintana, R. Rodil, Organophosphorus flame retardants and plasticizers in water and air I. Occurrence and fate, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 727–737. doi:10.1016/j.trac.2008.07.002.
- [14] W. D'Hollander, L. Roosens, A. Covaci, C. Cornelis, H. Reynders, K. Van Campenhout, P. de Voogt, L. Bervoets, Brominated flame retardants and perfluorinated compounds in indoor dust from homes and offices in Flanders, Belgium, *Chemosphere.* 81 (2010) 478–487. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.07.043.
- [15] A. Dreyer, T. Kirchgeorg, I. Weinberg, V. Matthias, Particle-size distribution of airborne poly- and perfluorinated alkyl substances, *Chemosphere.* 129 (2015) 142–149. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.06.069.

- [16] A. Kärrman, G. Lindström, Trends, analytical methods and precision in the determination of perfluoroalkyl acids in human milk, *Trends Anal. Chem.* 46 (2013) 118–128. doi:10.1016/j.trac.2012.10.009.
- [17] M. Motas, C. Clementini, M.D. Pérez-cárceles, S. Jiménez, A. Cascone, T. Martellini, C. Guerranti, A. Cincinelli, Science of the Total Environment Perfluorinated carboxylic acids in human breast milk from Spain and estimation of infant's daily intake, *Sci. Total Environ.* 544 (2016) 595–600. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.059.
- [18] O. Lacina, P. Hradkova, J. Pulkrabova, J. Hajslova, Simple, high throughput ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry trace analysis of perfluorinated alkylated substances in food of animal origin: Milk and fish, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 4312–4321. doi:10.1016/j.chroma.2011.04.061.
- [19] J.B. Quintana, R. Rodil, T. Reemtsma, M. García-López, I. Rodríguez, Organophosphorus flame retardants and plasticizers in water and air II. Analytical methodology, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 904–915. doi:10.1016/j.trac.2008.08.004.
- [20] J.W. Kim, T. Isobe, K.H. Chang, A. Amano, R.H. Maneja, P.B. Zamora, F.P. Siringan, S. Tanabe, Levels and distribution of organophosphorus flame retardants and plasticizers in fishes from Manila Bay, the Philippines, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 3653–3659. doi:10.1016/j.envpol.2011.07.020.
- [21] F.Y. Jinjian Ding, Zemin Xu, Wei Huang, Limin Feng, Organophosphate ester flame retardants and plasticizers in human placenta in Eastern China, *Sci. Total Environ.* 554–555 (2016) 211–217.
- [22] J.-W. Kim, T. Isobe, M. Muto, N.M. Tue, K. Katsura, G. Malarvannan, A. Sudaryanto, K.-H. Chang, M. Prudente, P.H. Viet, S. Takahashi, S. Tanabe, Organophosphorus flame retardants (PFRs) in human breast milk from several Asian countries, *Chemosphere.* 116 (2014) 91–97. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.033.
- [23] A.M. Sundkvist, U. Olofsson, P. Haglund, Organophosphorus flame retardants and plasticizers in marine and fresh water biota and in human milk, *J. Environ. Monit.* 12 (2010) 943–951. doi:10.1039/b921910b.

- [24] N. León, A. Pastor, V. Yusà, Target analysis and retrospective screening of veterinary drugs, ergot alkaloids, plant toxins and other undesirable substances in feed using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, *Talanta*. 149 (2016) 43–52. doi:10.1016/j.talanta.2015.11.032.
- [25] H. Kadar, B. Veyrand, A. Barbarossa, G. Pagliuca, A. Legrand, C.C. Boshier, C.Y. Boquien, S. Durand, F. Monteau, J.P. Antignac, B. Le, B. Le Bizec, Development of an analytical strategy based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry for measuring perfluorinated compounds in human breast milk: Application to the generation of preliminary data regarding perinatal exposure in France, *Chemosphere*. 85 (2011) 473–480. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.077.
- [26] L. Zhang, X. Luo, Z. Niu, X. Ye, Z. Tang, P. Yao, Rapid screening and identification of multi-class substances of very high concern in textiles using liquid chromatography-hybrid linear ion trap orbitrap mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1386 (2015) 22–30. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.077.
- [27] F. Hernández, J. V. Sancho, M. Ibáñez, E. Abad, T. Portolés, L. Mattioli, Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences, *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1251–1264. doi:10.1007/s00216-012-5844-7.
- [28] A. Kaufmann, S. Walker, Post-run target screening strategy for ultra high performance liquid chromatography coupled to Orbitrap based veterinary drug residue analysis in animal urine, *J. Chromatogr. A*. 1292 (2013) 104–110. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.019.
- [29] H. Surma, Magdalena. Zieliński, What do We Know about the Risk Arising from Perfluorinated Compounds, *POLISH J. Environ. Stud.* 24 (2015) 449–457. doi:10.15244/pjoes/30929.
- [30] V. Yusa, M. Millet, C. Coscolla, M. Roca, Analytical methods for human biomonitoring of pesticides. A review, *Anal. Chim. Acta*. 891 (2015) 15–31. doi:10.1016/j.aca.2015.05.032.
- [31] I. van der Veen, J. de Boer, Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis, *Chemosphere*. 88 (2012) 1119–1153. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.03.067.

- [32] W.M.A. Niessen, P. Manini, R. Andreoli, Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 881–899. doi:10.1002/mas.20097.
- [33] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 3929–3937. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.060.
- [34] Council of the European Union, COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT. Progress Report on the implementation of the 'European Environment and Health Action Plan 2004 - 2010', 2010.
- [35] A.L. Heffernan, K. Thompson, G. Eaglesham, S. Vijayasarathy, J.F. Mueller, P.D. Sly, M.J. Gomez, Rapid, automated online SPE-LC-QTRAP-MS/MS method for the simultaneous analysis of 14 phthalate metabolites and 5 bisphenol analogues in human urine, *Talanta.* 151 (2016) 224–233. doi:10.1016/j.talanta.2016.01.037.
- [36] I. Zabaleta, E. Bizkarguenaga, A. Prieto, M. Ortiz-Zarragoitia, L.A. Fernández, O. Zuloaga, Simultaneous determination of perfluorinated compounds and their potential precursors in mussel tissue and fish muscle tissue and liver samples by liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1387 (2015) 13–23. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.089.
- [37] J.M. Keller, A.M. Calafat, K. Kato, M.E. Ellefson, W.K. Reagen, M. Strynar, S. O 'connell, C.M. Butt, S.A. Mabury, J. Small, D.C.G. Muir, S.D. Leigh, M.M. Schantz, J.M. Keller, S. O 'connell, A.M. Calafat, : K Kato, M.E. Ellefson, W.K. Reagen, M. Strynar, C.M. Butt, S.A. Mabury, J. Small, D.C.G. Muir, S.D. Leigh, M.M. Schantz, Determination of perfluorinated alkyl acid concentrations in human serum and milk standard reference materials, *Anal Bioanal Chem.* 397 (2010) 439–451. doi:10.1007/s00216-009-3222-x.
- [38] General Directorate for Health and Food Safety. European Commission, Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis. SANTE/11813/2017., 2017.
- [39] J.S.-V. D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Amsterdam, 1997.

- [40] J.M. Marín, E. Gracia-Lor, J. V Sancho, F.J. López, F. Hernández, Application of ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples Study of matrix effects, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 1410–1420. doi:10.1016/j.chroma.2008.12.094.
- [41] M. Lorenzo, M. Farré, C. Blasco, M. Onghena, Y. Picó, D. Barceló, Perfluoroalkyl substances in Breast milk, infant formula and baby food from Valencian Community (Spain), 6 (2016) 108–115. doi:10.1016/j.enmm.2016.09.001.
- [42] US Environmental Protection Agency, Exposure Factors Handbook: 2011 Edition, U.S. Environ. Prot. Agency. EPA/600/R- (2011) 1–1466. doi:EPA/600/R-090/052F.

## Appendix A. Supplementary Data

### 1. Multivariate MS variables optimization

A statistical design of experiments (DoE) was the procedure selected for the optimization of the most relevant parameters affecting ion source. This multivariate optimization was performed following indications by León et al. [1] in a previous study.

a) A screening design (Plackett-Burman, PB) was firstly conducted to obtain the most influencing factors affecting ESI ion source. The minimum and maximum levels for each of the several factors were set based on the criteria followed by León et al. [1] such as, ion-source type (H-ESI II probe) and ranges provided by the ion-source manufacturer for standard flow rates (60 - 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ ). The parameters were: sheath gas pressure (SGP, 5 - 70 a.u.), auxiliary gas (AG, 0 - 20 a.u.), spray voltage (SV, 2 - 5 KV), capillary temperature (CT, 100 - 450  $^{\circ}\text{C}$ ), skimmer voltage (SKV, 1 - 50 V), heater temperature (HT, 100 - 500  $^{\circ}\text{C}$ ) and capillary voltage (CV, 20 - 50 V). A total of 30 experiments were performed in two blocks (2 replicates) including 12 design runs, and 3 center points each.

b) Central Composite Design (CCD): This type of experimental design was previously performed by Coscollà et al. [2] and León et al. [1] for finding operating conditions or parameters that improve and maximize compound response. A total of 31 experiments (two-level full factorial design ( $2^4$ ), providing 16 cube points, 7 center points in cube and 8 axial points) were randomized for protection against the effect of hidden variables.

Table S1 shows the estimated effects of the seven factors (SGP, AG, SV, CT, CV, SKV and HT) and the statistical significance at 95% confidence level when a Plackett-Burman screening design was applied for the 21 target compounds.



Table S1. Plackett-Burman screening. Effects and p-values obtained for some compounds for the seven selected parameters.

Compounds	Sheath gas		Auxiliary gas		Spray Voltage		Capillary Temperature		Skimmer voltage		Heater Temperature		Capillary voltage	
	Effect	p-value	Effect	p-value	Effect	p-value	Effect	p-value	Effect	p-value	Effect	p-value	Effect	p-value
TMP	2743291	0.218	-283754	0.897	748205	0.733	-7911604	<b>0.001</b>	9373421	<b>0.000</b>	2544590	0.252	479792	0.827
TEP	3351764	0.443	-3167503	0.468	-3037927	0.487	-10537426	<b>0.023</b>	10599936	<b>0.022</b>	3341114	0.445	3121737	0.475
TCEP	-55274	0.491	298465	<b>0.001</b>	311764	<b>0.001</b>	-300268	<b>0.001</b>	314088	<b>0.001</b>	-56063	0.485	-297941	<b>0.001</b>
TiPrP	5637061	0.160	-5540429	0.167	-5473725	0.172	-9869196	<b>0.019</b>	9764501	<b>0.020</b>	5570357	0.165	5502438	0.170
TnPrP	4263912	0.230	-3785187	0.285	-3659772	0.300	-8521134	<b>0.022</b>	8461716	<b>0.023</b>	4193773	0.237	3740633	0.290
TCPP	-18569	0.866	375943	<b>0.002</b>	382249	<b>0.002</b>	-416266	<b>0.001</b>	418983	<b>0.001</b>	-20363	0.853	-375943	<b>0.002</b>
TPnP	4550759	<b>0.043</b>	5016867	<b>0.027</b>	5610786	<b>0.015</b>	-5269714	<b>0.021</b>	6693811	<b>0.005</b>	4126098	0.065	-4597047	0.042
TnBP	3703684	0.136	-2741591	0.264	-2535026	0.301	-6582319	<b>0.012</b>	6662726	<b>0.011</b>	3648756	0.142	2725289	0.267
TBEP	4060388	<b>0.014</b>	-2080375	0.183	-907151	0.554	-4823433	<b>0.004</b>	5870179	<b>0.001</b>	4011226	<b>0.015</b>	2052221	0.188
PFPeA	10810799	0.103	10941486	0.990	-10848003	0.102	-15747261	<b>0.022</b>	15374531	<b>0.025</b>	10687133	0.107	10645221	0.108
PFBS	17584862	0.121	25695296	<b>0.028</b>	-14037115	0.211	-24537968	<b>0.035</b>	40928077	<b>0.001</b>	20248781	0.077	22646475	<b>0.050</b>
PFHxA	9767366	0.140	-9815422	0.138	-9673916	0.143	-16287869	<b>0.018</b>	15904347	<b>0.021</b>	9584180	0.147	9581379	0.147
PFHpA	7354604	0.207	-7367534	0.206	-7198573	0.217	-14777778	<b>0.016</b>	14393101	<b>0.019</b>	7144591	0.220	7164942	0.219
PFHxS	28450451	<b>0.012</b>	-9237660	0.379	4523644	0.664	-35074141	<b>0.003</b>	55193479	<b>0.000</b>	24857915	<b>0.025</b>	12440965	0.240
PFOA	6155338	0.228	-6156116	0.228	-5986154	0.241	-13001286	<b>0.016</b>	12657106	<b>0.019</b>	5954745	0.243	5991250	0.240
PFNA	3043777	0.283	-3022188	0.286	-2901797	0.305	-7397117	<b>0.014</b>	7155024	<b>0.017</b>	2907298	0.305	2905364	0.305
PFOS	22968776	<b>0.001</b>	1284696	0.833	4637113	0.450	-21634849	<b>0.002</b>	37953801	<b>0.000</b>	16203320	<b>0.014</b>	5247864	0.393
PFDA	3088349	0.171	-3004658	0.182	-2926184	0.193	-5757192	<b>0.015</b>	5594911	<b>0.018</b>	2989528	0.184	2925335	0.193
PFUGA	594574	0.350	-570838	0.370	-539633	0.396	-1704580	<b>0.012</b>	1643475	<b>0.015</b>	558058	0.380	542607	0.393
PFDS	6780386	<b>0.008</b>	1210939	0.604	484570	0.835	-4614011	0.058	10981697	<b>0.000</b>	3168631	0.183	2349631	0.319
PFDoA	387316	0.325	-414334	0.293	-418618	0.288	-1027190	<b>0.014</b>	977765	<b>0.015</b>	383032	0.330	364909	0.353

p-value < 0.05 are in bold.

In this study, SKV and CT were selected because of a significant effect on many of the 21 target compounds ( $p$ -value < 0.05). The remaining five factors: SGP, AG, SV, HT and CV, had no significant effect on the majority of compounds. However, in order to enhance signals for some critical compounds, such as PFHxS, PFOS, TCEP and TCPP, SV and HT were also selected.

For running the CCD experiments, the sheath gas pressure was fixed at a higher value (50 a.u) because it had a positive effect on many of the 21 target compounds; the auxiliary gas was fixed at an intermediate value (10 a.u) because it had both positive and negative effects (see Table S1), and the capillary voltage was set at 40 V because it also had positive and negative effects.

The analytical responses obtained were fitted into an equation that included second-order (curvature) and interaction terms. The model was validated using a regression analysis of variance (ANOVA). As an example, four-dimensional response surfaces of two factors at a constant value of the other two factors are presented in Figure S1 for TCEP, TPhP, PFOA and PFOS.

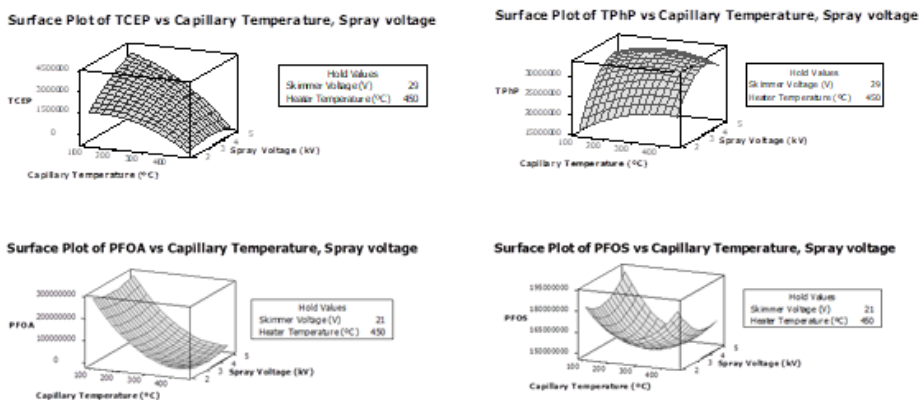


Figure S1. Response surface plots for TCEP, TPhP, PFOA and PFOS (fixed values for Heater Temperature, 50 °C, and Skimmer Voltage, 29 V for positive ionization and 21 V for negative ionization).

Using the “response optimizer” in the MINITAB program we can find and select one or more settings that simultaneously maximized the responses of each compound. Desirability for each response is 0.0 for the lowest value obtained in the CCD, increases as response values increase; and it is 1.0 for the highest response obtained in the experiments. Therefore, we have to maximize the

global desirability that combined the individual desirability of all response variables into a single measure taking into account that all response variables hold the same importance. Under these conditions, as the ionization mode differs depending on the compounds, and spray voltage and skimmer voltage could work at different values in positive and negative mode, the list of 21 compounds was divided into two lists according to the ionization mode.

The optimized factor settings were: SV, positive mode 3.6 kV and negative mode 2.5 kV; CT, 100 °C; SKV, positive mode 29 V and negative mode 21 V; HT, 450 °C which provided a composite desirability of 0.91589 positive mode analytes, and 1.00000 for negative mode analytes.

#### *References*

- [1] N. León, A. Pastor, V. Yusà, Target analysis and retrospective screening of veterinary drugs, ergot alkaloids, plant toxins and other undesirable substances in feed using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, *Talanta*. 149 (2016) 43–52. doi:10.1016/j.talanta.2015.11.032.
- [2] C. Coscollà, N. León, A. Pastor, V. Yusà, Combined target and post-run target strategy for a comprehensive analysis of pesticides in ambient air using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*. 1368 (2014) 132–142. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.067.



### 3. DISCUSIÓN

En la **Tabla 1** del *Artículo Científico 3* se describen las características analíticas de las sustancias objeto de estudio, cuyo conocimiento es imprescindible para la optimización y desarrollo del método. Dicha tabla incluye, para cada analito y los patrones internos correspondientes, su composición elemental, el ión diagnóstico (ión quasi-molecular), la masa exacta de dicho ion, y la composición y masa exacta de los fragmentos; se incluye también, una vez optimizada la cromatografía, el tiempo de retención de los analitos.

#### Optimización de los parámetros de la fuente de ionización (HESI-II)

Considerando la complejidad del proceso, la optimización de los parámetros de la fuente de ionización se llevó a cabo mediante diseño experimental. Una vez seleccionados los principales parámetros a estudiar, los cuales fueron el voltaje de spray (SV), la presión del gas auxiliar (AG), el voltaje del capilar (CV), la temperatura de calentamiento (HT), la presión de gas envolvente (SGP), la temperatura del capilar (CT) y el voltaje del skimmer (SKV), se procedió, en primer lugar, a realizar un cribado mediante diseño de experimentos del tipo Plackett-Burman (PB). Con el cual, se obtienen los parámetros significativos para la optimización (**Tabla S1** en la información adicional del *Artículo Científico 3*). De los siete parámetros que inicialmente se tuvieron en cuenta, resultaron significativos: SKV, CT, SV y HT. En segundo lugar, y a partir de valores intermedios para los parámetros no significativos, se realizó un CCD para encontrar los valores óptimos de los parámetros significativos. En la **Tabla 5** se muestran los valores seleccionados y optimizados de cada uno de los parámetros.

**Tabla 5.** Valores óptimos de los parámetros de la fuente de ionización y la deseabilidad global obtenida del CCD.

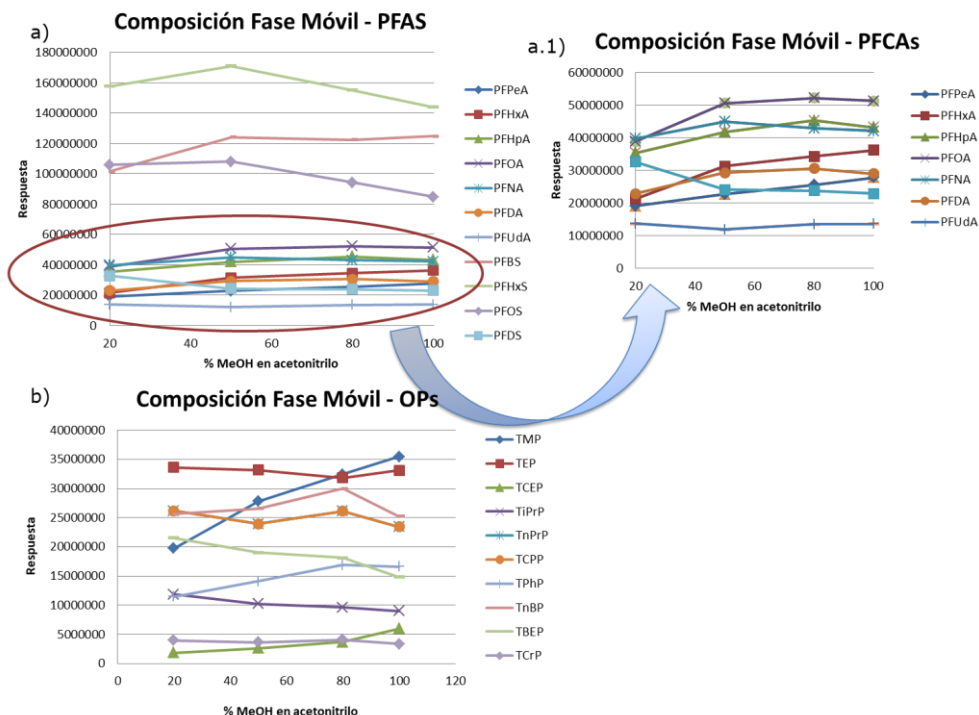
Modo Ionización	SKV (V)	SV (kV)	CT (°C)	HT (°C)	CV (V)	AG (a.u.)	SGP (a.u.)	Deseabilidad
<b>Positivo</b>	29	+3.6	100	450	40	10	50	0.91589
<b>Negativo</b>	21	-2.5						1.00000

Por otro lado, una vez seleccionados los valores de los parámetros de la fuente, fue necesario encontrar los fragmentos característicos de cada

analito. Para ello, se investigó el espectro de fragmentación correspondiente al tiempo de retención de cada molécula, y además, para reforzar este estudio de fragmentos, se realizó una revisión precisa de la bibliografía existente. La metodología desarrollada y optimizada se dividió en dos métodos instrumentales distintos, el primero mediante ionización ESI en modo positivo, para los OPs, el cual incluye dos eventos (uno sin fragmentación, barrido completo; y otro con fragmentación, HCD 30 eV); y el segundo mediante ionización ESI en modo negativo, para las PFAS, el cual consta de tres eventos, un barrido completo sin fragmentación, fragmentando a 10 eV y fragmentando también a 35 eV, respectivamente.

#### Optimización separación cromatográfica

La separación cromatográfica de los analitos de interés es una tarea compleja, ya que presentan un amplio abanico de polaridades, desde sustancias muy polares a otras apolares. Por ello, se seleccionó una columna cromatográfica que cubriera estas especificaciones, como es la Hypersil Gold (100 mm x 2.1 mm, 1.9  $\mu\text{m}$ ). Se valoraron y comprobaron diferentes fases móviles y gradientes de fase móvil, entre ellas, acetonitrilo y metanol como fase orgánica de la fase móvil. Además de diferentes modificadores, como ácido acético, acetato amónico, ácido fórmico y acetato fórmico, añadidos tanto a la fase acuosa como a la orgánica. Los resultados mostraron que, en el caso de las PFAS, no había diferencias significativas entre ácido acético y acetato amónico, sin embargo, las respuestas eran inferiores con ácido fórmico y formiato amónico. En el caso de los OPs, la señal aumentaba considerablemente cuando se utilizaba el ácido acético como modificador de la fase móvil. Lo cual es lógico ya que el ácido acético es un ácido débil, por lo que la presencia de protones en la fase móvil va a favorecer la ionización positiva, que es el modo de ionización de los OPs. En cuanto a la elección del disolvente de la fase orgánica, se realizaron pruebas con diferentes proporciones de metanol en acetonitrilo, y aunque no se encontraron diferencias significativas para la mayoría de los analitos cuando se aumentaba la proporción de metanol, para algunos como el TMP, TnBP y TPhP se observaron mejores resultados con un 80% de metanol (**Figura 16**).



**Figura 16.** Variación de la respuesta en función de la proporción de metanol en la fase móvil: a) PFAS; a.1) PFCAs; b) OPs.

Estudio del efecto matriz

Teniendo en cuenta que el uso de la LC-MS viene afectada, en la mayoría de los casos, por la existencia de efecto matriz, y teniendo en cuenta la complejidad de la leche materna, se consideró necesario realizar un estudio del efecto matriz existente en las condiciones del método desarrollado, de esta manera, fue posible valorar los diferentes modos de eliminar o compensar dicho efecto matriz. El estudio se realizó del mismo modo que se ha explicado en el *Capítulo 2* de la presente **Tesis Doctoral**.

Se clasificó el efecto matriz en tres categorías, en función de sus valores. Cuando su valor se encontraba entre el 80% y el 120%, se consideró que no había efecto matriz; si los valores estaban entre el 40% y 80% y entre 120% y 150%, se trataba de un efecto matriz medio; y si estaba por debajo del 40% y por encima del 150% nos encontramos con un efecto matriz elevado. Así pues, según la **Figura 1** del *Artículo Científico 3*, el peor de los casos se muestra para la mayoría de los OPs, los cuales presentan efecto

matriz por supresión iónica en todos los casos. Por una parte, el efecto matriz observado es elevado, y con valores mínimos del 13% y 19% para el TMP y el TPhP, respectivamente; y por otra parte, compuestos de la misma familia, como el TCEP (73%), TiPrP (75%), TnPrP (74%), TCPP (59%), TnBP (47%) y TBEP (62%) presentan un efecto matriz moderado. Por el contrario, la mayoría de PFAS no muestran efecto matriz, y solo en algunas sustancias, como en el PFPeA (79%), PFDA (74%), PFDaA (62%), PFOS (77%) y PFDS (70%) se detecta un efecto matriz moderado.

Según distintos autores, el efecto matriz puede estar directamente relacionado con la fuente de ionización y sus modos de trabajo. Con respecto a la ESI, la supresión iónica puede ser debida a la presencia de compuestos interferentes a elevada concentración, los cuales pueden aumentar la viscosidad y tensión superficial de las gotas producidas en la interfase ESI, facilitando la formación de iones aductos o pares iónicos, y reduciendo así, la capacidad de los analitos de alcanzar la fase gas con la consecuente disminución en la eficacia de la ionización (Gosetti et al. 2010). Otros estudios comparan el uso de la ESI en modo positivo con el modo negativo para un mismo grupo de sustancias (Marín et al. 2009), llegando a la conclusión de que en la mayoría de los casos una serie de compuestos ionizados en modo negativo no mostraban supresión iónica o con valores moderados. Sin embargo, en los mismos compuestos ionizados en modo positivo, se detectaban valores de efecto matriz por supresión iónica significativamente mayores. Lo que está en coherencia con los resultados de efecto matriz obtenidos para los OPs, ionizados en modo positivo.

A la vista de estos resultados se valoraron diferentes modos de eliminar o compensar dicho efecto matriz. Para ello, las opciones tenidas en cuenta son las que se indican a continuación:

- Modificando las condiciones de ionización. Los OPs no se ionizan en modo negativo, así que esta posibilidad fue descartada inmediatamente.
- Modificando o añadiendo etapas de purificación, lo que conlleva un mayor tiempo de análisis y una mayor manipulación de la muestra, aumentando los errores analíticos asociados al tratamiento de muestra, además, de afectar negativamente a la posibilidad de futuros análisis *post-target*.
- Modificación de las condiciones cromatográficas, lo que ya se tuvo en cuenta en el momento de su optimización.



- Dilución de la muestra, pero teniendo en cuenta que no todos los analitos presentan efecto matriz, y que esto compromete directamente a la sensibilidad del método, esta opción fue descartada.
- Mediante técnicas de cuantificación, como calibración en matriz y calibración interna.

Esta última medida fue la seleccionada en este estudio, y como se puede apreciar en la misma **Figura 1** del artículo, en la que se muestra el efecto matriz observado mediante la corrección con patrones internos, nos encontramos con situaciones ideales como el caso del TPhP, en la que el patrón interno utilizado es el mismo marcado isotópicamente, y por tanto la corrección del efecto matriz es completa. En otros casos en los que como patrón interno no se hace uso de la misma sustancia marcada isotópicamente, no se consigue corregir dicho efecto matriz, como es el caso del TMP. Por ello, se decidió hacer uso de la combinación entre la calibración en matriz con la calibración interna.

Validación y protocolo de aseguramiento de la calidad

La validación de esta metodología se llevó a cabo siguiendo la guía de validación incluida en la Decisión de la Comisión 657/2002/CE (Commission Decision 2002/657/EC 2002). Los parámetros validados junto con el modo de evaluar los mismos y sus resultados, se incluyen en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Parámetros validados, cómo han sido evaluados y resultados de la validación de los PBDEs.

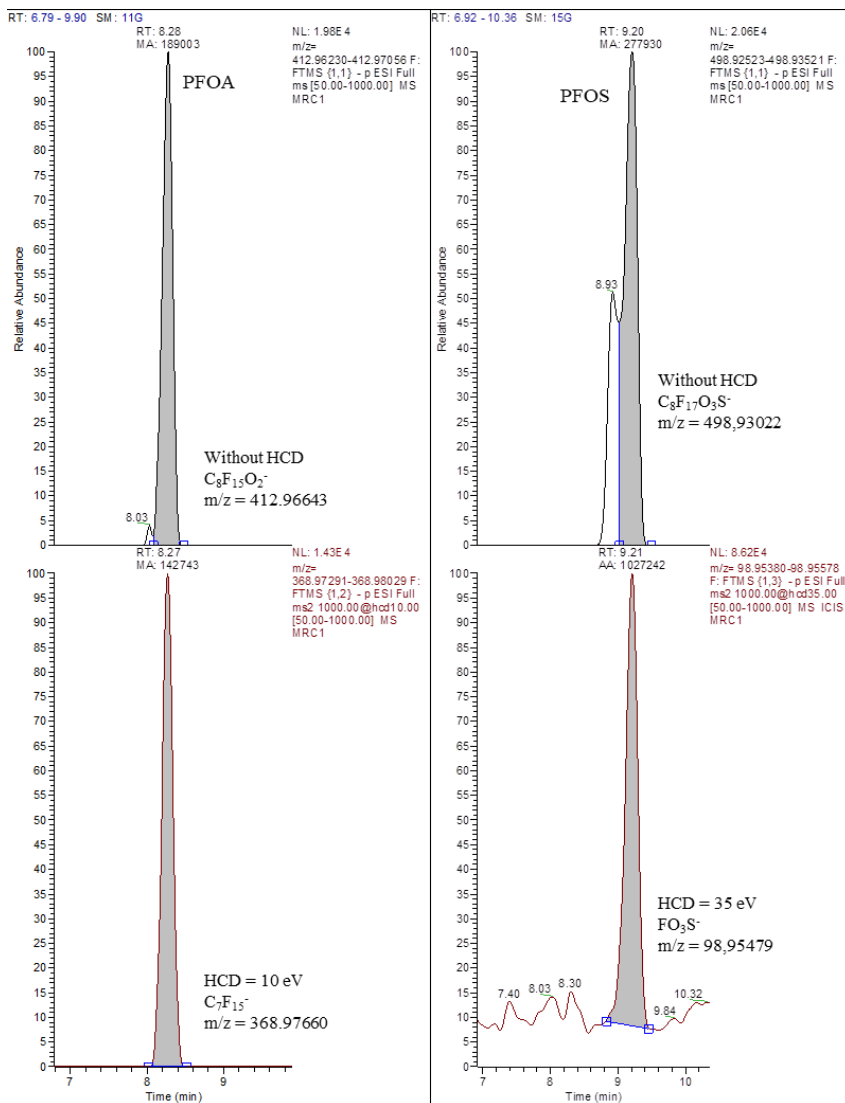
Parámetros estudiados en la validación	Realización	Resultados
<b>Linealidad</b>	Curva de calibración con matriz extraída y con patrones internos, de 5 puntos por triplicado ( $R^2$ y desviaciones residuales individuales).	5 puntos de curva entre 1 y 5 ng/mL, dependiendo del analito $\rightarrow R^2 > 0.99$ y residuales $< 20\%$ , en todos los casos.
<b>Exactitud (recuperación)</b>	Análisis de muestras de campo blancas fortificadas a 2 niveles de concentración, al LOQ y a un nivel intermedio de la curva de calibración. Las secuencias analíticas fueron de 3 días y 3 réplicas a cada uno de los niveles cada día.	Las recuperaciones relativas medias (n=9 en cada nivel) fueron desde el 84% (PFHxS, nivel intermedio) al 110% (TMP y PFOA, ambos al LOQ).

<b>Precisión (reproducibilidad)</b>	Análisis de muestras de campo blancas fortificadas a 2 niveles de concentración. Las secuencias analíticas fueron de 3 días y 3 réplicas a cada uno de los niveles cada día.	Las desviaciones estándar relativas fueron en todos los casos $\leq 25\%$ (PFDoA 24%, nivel intermedio).
<b>Límite de cuantificación (LOQ)</b>	Establecido como el nivel más bajo validado en el que se obtienen valores de recuperación y de precisión satisfactorios (70 – 120% y $< 25\%$ ). Además de cumplir con los criterios de identificación y confirmación establecidos más abajo.	Los límites de cuantificación obtenidos fueron de entre 0.066 ng/mL y 0.666 ng/mL para los PFAS, y entre 1.9 ng·g <sup>-1</sup> grasa y 19.0 ng/g grasa para los OPs. Tanto las recuperaciones como la precisión a este nivel cumplieron con los criterios establecidos.
<b>Límite de detección del método (MDL)</b>	Estimado como 3*S/N en el nivel más bajo fortificado (Heffernan et al. 2016; Zabaleta et al. 2015).	Los MDLs estimados fueron: 0.001 – 0.056 ng/mL para PFAS y 0.02 – 1.02 ng/g grasa.
<b>Identificación y confirmación</b>	Se establecieron 3 criterios en base a la guía SANTE/11813/2017 (European Commission SANTE/11813/2017).	<ul style="list-style-type: none"> <li>i) Tolerancia máxima de masa exacta: 5 ppm.</li> <li>ii) <math>\pm 2.5\%</math> RRT del analito en la muestra con respecto al de la muestra control;</li> <li>iii) Ratio del ión fragmento relativo al ión quasi-molecular <math>\pm 30\%</math> del valor obtenido para el analito correspondiente en las muestras control.</li> </ul>

Todos los parámetros validados cumplen con los criterios establecidos, aunque unos pocos analitos presentan (ver **Tabla 2** del *Artículo Científico 3*) valores de precisión cercanos al 25%. Esto se debe al uso de patrones internos marcados isotópicamente no análogos a dichos analitos, por ejemplo, para el TnBP (corregido con el d15-TEP) y PFDoA (corregido con el M9PFNA), se obtuvieron RSDs del 23% y 24%, respectivamente. Por tanto, mediante el uso de todos los patrones internos marcados isotópicamente análogos a los analitos, se vería mejorada la precisión del método. En la **Figura 2** del *Artículo Científico 3* se muestra un cromatograma típico de una muestra control adicionada al LOQ, en el que aparecen todos los analitos validados. Los valores de MDL obtenidos para los PFAS son comparables a otros estudios similares, sin embargo, para los OPs, estos niveles son algo más elevados en el presente estudio. Esto es debido al compromiso alcanzado para poder incluir en una misma metodología, dos familias de

compuestos con propiedades físico-químicas diferentes. Aun así, teniendo en cuenta los niveles habituales de estas sustancias en la leche materna, los MDLs son adecuados para determinar los PFAS y OPs y conocer su frecuencia de aparición en estudios de biomonitoring.

Además de todo esto, el método validado fue aplicado a un material de referencia de leche materna. Se trata del SRM 1954, cuyos valores de PFAS no están certificados, sin embargo, sí que existen valores de PFOA y PFOS consensuados ( $0.13 \pm 0.04$  ng/g y  $0.16 \pm 0.03$  ng/g, respectivamente) por seis laboratorios diferentes, tal y como indican Keller et al. en su estudio (Keller et al. 2010). Por tanto, se realizó el análisis de dicho material de referencia por quintuplicado en diferentes días. Los resultados medios obtenidos fueron de  $0.10 \pm 0.01$  ng/g para el PFOA y  $0.14 \pm 0.02$  ng/g para el PFOS. Los cuales mostraron estar en consonancia con dichos valores establecidos. En la **Figura 17**, se muestran los picos del PFOA y del PFOS en el material de referencia junto con sus fragmentos característicos.



**Figura 17.** Cromatograma de PFOA y PFOS: iones quasi-moleculares junto con sus fragmentos característicos.

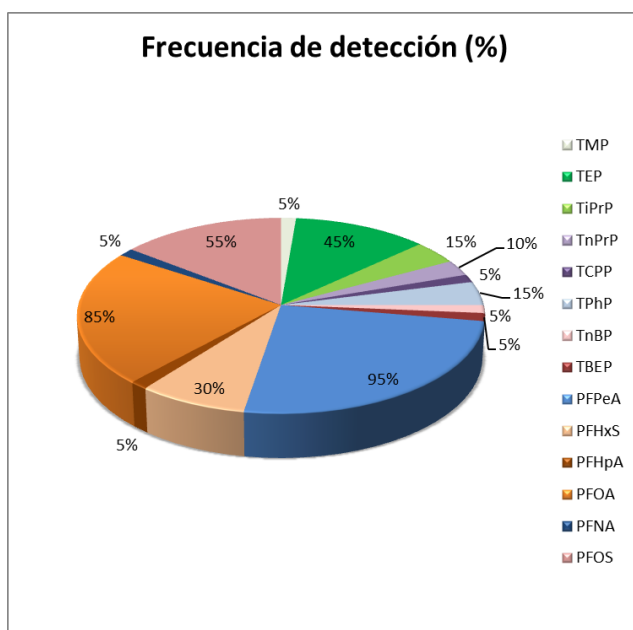
En cada secuencia analítica, tanto de validación como de muestras, se realizaron también controles de calidad internos, cuyo fin fue el aseguramiento de la calidad del método. Para ello, se incluyeron un blanco de reactivos y un blanco de muestra para chequear posibles contaminaciones y la existencia de posibles interferencias. Y se incluyeron

también, dos blancos de muestra fortificados a dos niveles de concentración diferentes (LOQ e intermedio).

Aplicación a muestras de campo

La metodología desarrollada y validada fue aplicada a 20 muestras de leche materna. Dichas muestras pertenecían a un estudio inicial, dentro de un proyecto de biomonitorización en humanos (BETTERMILK). Dichas muestras, tal y como se indica en el artículo científico, fueron recogidas durante 2015 por 14 madres españolas, residentes en la Comunidad Valenciana, en momentos distintos dentro del periodo de lactancia. Todas las participantes dieron su consentimiento informado después de recibir toda la información pertinente.

En la **Tabla 3** del *Artículo Científico 3*, se resumen los resultados obtenidos en dichas muestras analizadas. En todas ellas, al menos un analito fue encontrado, y los resultados dieron lugar a las frecuencias de detección que se muestran en la **Figura 18**.



**Figura 18.** Frecuencias de detección para cada analito detectado.

Como se puede observar en esta figura, el PFPeA (95%) y el PFOA (85%) son las PFAS que aparecen con mayor frecuencia, seguidas por el PFOS

(55%); en cuanto a los OPs, se ha encontrado el TEP en un 45% de las muestras. Las concentraciones obtenidas, en el caso de las PFAS, fueron desde 0.070 ng/mL (PFNA) a 0.180 ng/mL (PFOA), en cuanto a los OPs, desde 1.9 ng/g grasa (TEP) a 19.0 ng/g grasa (TMP). Los resultados fueron comparados con otros estudios, y se comprobó que tanto los datos obtenidos de las medias como de las medianas, para las PFAS, eran comparables a los valores informados en dichos estudios. Por ejemplo, en nuestro estudio se obtuvieron concentraciones medias de PFOA y PFOS de 0.152 ng/mL y 0.066 ng/mL, respectivamente. M. Lorenzo et al. (Lorenzo et al. 2016) obtuvieron en muestras de leche materna de madres residentes en España de 0.177 ng/mL (100% frecuencia de aparición) y 0.050 ng/mL (60% frecuencia de aparición), respectivamente. En cuanto a los OPs, hasta la fecha no se habían realizado estudios sobre estos contaminantes en España. Sin embargo, se compararon nuestros resultados con otros obtenidos en estudios realizados en otros países, como es el caso de Sundkvist (Sundkvistet al. 2010), quienes estudiaron los niveles de OPs en Suecia, obteniendo concentraciones más elevadas que las nuestras en la Comunidad Valenciana.

A partir de los resultados obtenidos, se realizó una estimación, preliminar, de la exposición y el riesgo de los lactantes de 1-3 meses de edad, a dos de las sustancias estudiadas más relevantes, como son el PFOS y el PFOA. Para ello, se pretendía, en primer lugar, calcular la ingesta diaria en dos escenarios diferentes, con los datos de consumo medio de leche materna (140 mg/kg b.w. - día) y alto (190 mg/kg b.w. - día), combinados con la concentraciones medias de PFOS (0.066 ng/mL) y de PFOA (0.0152 ng/mL) obtenidas en el presente estudio, y en segundo lugar, comparar los valores obtenidos de ingesta diaria en ambos escenarios (medio, 0.0092 µg/kg b.w. - día y alto, 0.01254 µg/kg b.w. - día de PFOS; medio, 0.0021 µg/kg b.w. - día y alto, 0.0029 µg/kg b.w. - día de PFOA) con la ingesta diaria admisible (TDI, 0.15 µg/kg b.w. - día de PFOS y 1.5 µg/kg b.w. - día de PFOA). Por tanto, ni aún en el peor de los escenarios, la ingesta diaria de ambos analitos es muy inferior a su TDI, por lo que se concluye que con los resultados obtenidos no existe riesgo.

Con todo esto, hay que resaltar que en el presente estudio se desarrolló y validó una nueva metodología para la determinación de dos grupos de

sustancias muy diferentes (PFAS y OPs), en cuanto a sus propiedades físico-químicas, utilizando una técnica instrumental novedosa como es la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución. Se obtuvieron datos de los parámetros de validación adecuados para el uso de esta metodología en programas de biomonitorización. El método validado se aplicó a un total de 20 muestras de leche materna, además de a un material de referencia, obteniendo niveles en consonancia con otros estudios.

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities L221 (2002) pp 8-36.

Erick, M. (2018). *Breast milk is conditionally perfect*. Medical Hypotheses, 111, 82–89. doi:10.1016/j.mehy.2017.12.020.

European Commission (2017) SANTE/11813/2017. *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed*.

Gosetti, F., Mazzucco, E., Zampieri, D. & Gennaro, M.C. (2010). *Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1217, 3929–3937. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.060.

Heffernan, A.L., Thompson, K., Eaglesham, G., Vijayasarathy, S., Mueller, J.F., Sly, P.D. & Gomez, M.J. (2016). *Rapid, automated online SPE-LC-QTRAP-MS/MS method for the simultaneous analysis of 14 phthalatemetabolites and 5 bisphenol analogues in human urine*. Talanta, 151, 224–233. doi:10.1016/j.talanta.2016.01.037.

Keller, J.M., Calafat, A.M., Kato, K., Ellefson, M.E., Reagen, W.K., Strynar, M., O'Connell, S., Butt, C.M., Mabury, S.M., Small, J., Muir, D.G.C., Leigh, S.L. & Schantz, M.M. (2010). *Determination of perfluorinated alkyl acid concentrations in human serum and milk standard reference materials*. Analytical Bioanalytical Chemistry, 397, 439–451. doi:10.1007/s00216-009-3222-x.

Lankova, D., Lacina, O., Pulkrabova, J. & Hajslova, J. (2013). *The determination of perfluoroalkyl substances, brominated flame retardants and their metabolites in human breast milk and infant formula*. Talanta, 117, 318–325. doi:10.1016/j.talanta.2013.08.040.



- León, N., Pastor, A. & Yusà, V. (2016). *Target analysis and retrospective screening of veterinary drugs, ergot alkaloids, plant toxins and other undesirable substances in feed using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry*. *Talanta*, 149, 43–52. doi:10.1016/j.talanta.2015.11.032.
- Lorenzo, M., Farré, M., Blasco, C., Onghena, M., Picó, Y. & Barceló, D. (2016). *Perfluoroalkyl substances in Breast milk, infant formula and baby food from Valencian Community (Spain)*. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 6, 108–115. doi:10.1016/j.enmm.2016.09.001.
- Marín, J.M., Gracia-Lor, E., Sancho, J.V., López, F.J. & Hernández, F. (2009). *Application of ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples study of matrix effects*. *Journal of Chromatography A*, 1216, 1410–1420. doi:10.1016/j.chroma.2008.12.094.
- Picone, S. & Paolillo, P. (2013). *Chemical contaminants in breast milk*. *Early Human Development*, 89, 117–118. doi:10.1016/S0378-3782(13)70124-5.
- Lopes, B.R., Barreiro, J.C. & Cass, Q.B. (2016). *Bioanalytical challenge: A review of environmental and pharmaceuticals contaminants in human milk*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 318–325. doi:10.1016/j.jpba.2016.06.012.
- Sundkvist, A.M., Olofsson, U. & Haglund, P. (2010). *Organophosphorus flame retardants and plasticizers in marine and fresh water biota and in human milk*. *Journal of Environmental Monitoring*, 12, 943–951. doi:10.1039/b921910b.
- Zabaleta, I., Bizkarguenaga, E., Prieto, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Fernández, L.A. & Zuloaga, O. (2015). *Simultaneous determination of perfluorinated compounds and their potential precursors in mussel tissue and fish muscle tissue and liver samples by liquid chromatography–electrospray-tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 1387, 13–23. doi:10.1016/j.chroma.2015.01.089.



***CAPÍTULO 4***  
***ESTUDIO DE LA EVALUACIÓN DEL RIESGO***  
***RELACIONADO CON LA EXPOSICIÓN***  
***A PBDEs POR CONSUMO***  
***DE PESCADO***





## **CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA EVALUACIÓN DEL RIESGO RELACIONADO CON LA EXPOSICIÓN A PBDES POR CONSUMO DE PESCADO.**

---

1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	235
2. <u>ARTÍCULO CIENTÍFICO 4</u>	239
<i>Probabilistic risk assessment of the exposure to polybrominated diphenyl ethers via fish and seafood consumption in the region of Valencia (Spain)</i>	
3. <u>DISCUSIÓN</u>	271
4. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	280

---



## 1. INTRODUCCIÓN

Los PBDEs, tal y como ya ha sido mencionado en el *Capítulo 1* de la presente **Tesis Doctoral**, forman parte de los conocidos como retardantes de llama bromados, los cuales se han aplicado en grandes cantidades como aditivos a polímeros, materiales plásticos y un gran número de productos de uso cotidiano, lo que significa que son fácilmente liberados al medio ambiente. De hecho, la preocupación sobre estas sustancias surgió cuando comenzaron a detectarse en los diferentes compartimentos del medio ambiente, distribuyéndose globalmente por el mismo (Fromme et al. 2016). Esto, junto con sus propiedades lipofílicas, y su persistencia, bioacumulación y biomagnificación demostradas, dio lugar a su prohibición e inclusión en el listado de Contaminantes Orgánicos Persistentes del Convenio de Estocolmo (Stockholm Convention SC-4/14 2009; Stockholm Convention SC-4/17 2009). Los PBDEs son considerados disruptores endocrinos, y la exposición humana a estas sustancias se da principalmente por tres rutas diferentes: i) ingesta de alimentos, ii) inhalación de aire o de polvo, y iii) adsorción dérmica. Entre ellas, la ingesta de alimentos es considerada la principal ruta de exposición humana a contaminantes como los PBDEs, y dentro de los alimentos, el pescado y productos de la pesca son de especial relevancia, por la afinidad de los PBDEs a los alimentos con un alto contenido lipídico, y por sus características bioacumulables y biomagnificables, ya mencionadas anteriormente. Lo que viene confirmado por los altos niveles de PBDEs detectados en esta matriz (Trabalón et al. 2017).

El conflicto existente entre los beneficios y los riesgos del consumo de pescado hace que exista un interés especial en la realización de estudios relacionados con esta matriz. Por una parte, el pescado está considerado como un alimento de alta calidad debido a su alto valor nutricional, aunque, por otra parte, se considera una matriz con una elevada prevalencia de

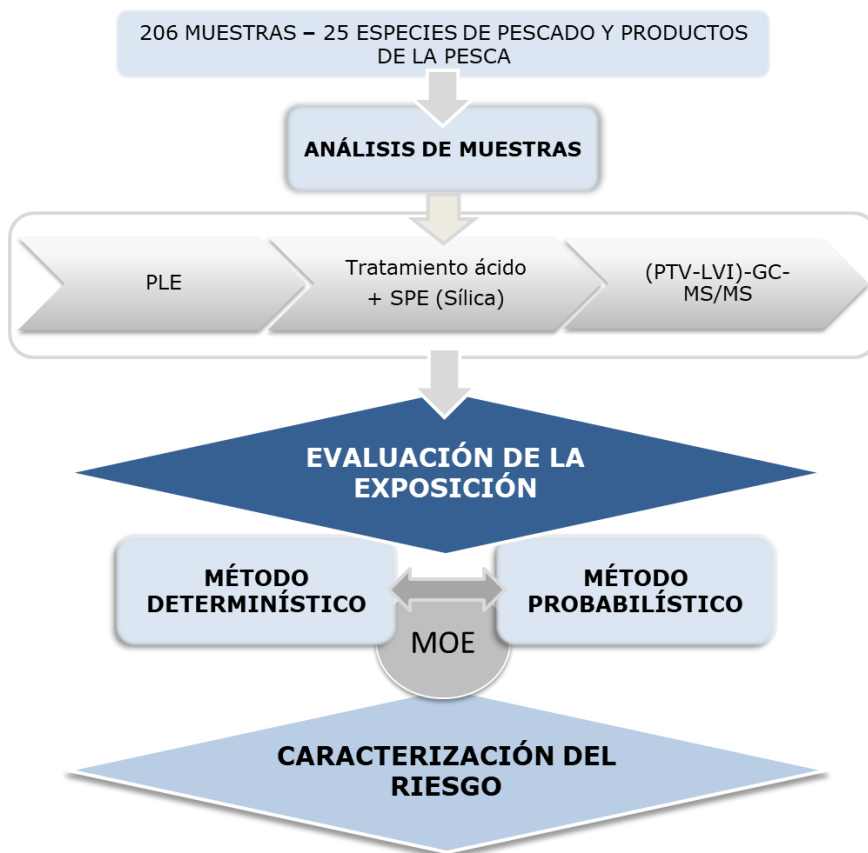
ciertos contaminantes, como dioxinas, PCBs o PBDEs (EFSA 2011; Perelló et al. 2015). Actualmente, no existe reglamentación en la que se establezcan contenidos máximos de PBDEs en los alimentos. No obstante, es posible realizar la evaluación del riesgo derivado del consumo de pescados y productos de la pesca contaminados a través de la ingesta diaria estimada de PBDEs y de las dosis de referencia (BMDs). En 2011, el panel científico de la EFSA, de contaminantes en la cadena alimentaria, obtuvieron dosis de referencia para el BDE-47, BDE-99 y BDE-153, concluyendo, además, como apropiado el enfoque basado en el margen de exposición (MOE), el cual proporciona una indicación del nivel de peligro sanitario sobre la presencia de PBDEs en los alimentos, y caracterizar, de este modo, el riesgo asociado a dicha exposición (EFSA 2011).

Dentro de las diferentes metodologías a utilizar para el estudio de la evaluación del riesgo, los métodos determinístico y probabilístico fueron seleccionados en el presente estudio con el fin de realizar una comparativa de los resultados obtenidos con cada uno de ellos. El modelo determinístico es el utilizado habitualmente en la evaluación de riesgo por sustancias químicas, en el cual se estima la ingesta diaria de dichas sustancias, en este caso, de PBDEs, a través de pescado y productos de la pesca, multiplicando la concentración media de un BDE en pescado, por el consumo medio, máximo y de percentil 95. De este modo se considera que la presencia de PBDEs es única a niveles promedio, lo que puede dar lugar a una sobreestimación de la exposición. Con el modelo probabilístico es posible estimar la ingesta diaria de ciertas sustancias, entre varios individuos en una población específica, teniendo en consideración la variabilidad en el consumo de alimentos. De este modo, es posible plantear diferentes escenarios entre poblaciones y consumo de alimentos, obteniendo una distribución global de la exposición de mínimo a máximo, con todos los modos y percentiles posibles (FAO/WHO 2006).

Por tanto, en el presente estudio, a partir de los resultados obtenidos en el análisis de 206 muestras de 25 especies de pescado y productos de la pesca distintas, muestreadas en un período de tiempo de 2007 - 2012, se calculó la ingesta de PBDEs resultante del consumo de pescado y productos de la pesca, se evaluó también el riesgo para la salud mediante las dos metodologías descritas, la determinística y la probabilística, comparando



después los resultados obtenidos en ambos procesos (**Figura 19**). Además, se utilizó el modelo MOE recomendado por EFSA, usando la carga corporal total como punto de partida para la caracterización del riesgo.



**Figura 19.** Estrategia de trabajo seguida en el *Artículo Científico 4*.

Las técnicas analíticas utilizadas para el análisis de las muestras fueron la extracción con disolvente presurizado (n-Hexano, 100 °C, 1500 psi, 3 ciclos de 5 min.), el tratamiento con ácido sulfúrico y la extracción en fase sólida mediante cartuchos de sílica y hexano como disolvente de elución. Por último, para la separación y detección de los analitos, se hizo uso de una cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas en tándem, inyectando grandes volúmenes de muestra (20 µL) mediante un PTV, la columna cromatográfica utilizada para la separación de los analitos fue una TR-5MS de 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 µm. La cuantificación de los analitos (BDE-28, BDE-47, BDE-49, BDE-66, BDE-99, BDE-100, BDE-119, BDE-139, BDE-153, BDE-154, BDE-155 y BDE-183) se llevó a cabo mediante

calibración interna, utilizando como patrones internos algunos de los PBDEs marcados isotópicamente ( $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-28,  $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-47,  $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-99 y  $^{13}\text{C}_{12}$ -BDE-153). Los análisis de las muestras se llevaron a cabo después de realizar la validación del método. Los principales parámetros validados fueron: exactitud (83 – 106%), precisión (coeficiente de variación entre 5 y 12%), límites de detección y cuantificación de 4 y 12.5 ng/kg, respectivamente. Además, en cada secuencia de muestras, se tuvieron en cuenta los controles de calidad interno oportunos, como blanco de reactivo, blanco de muestra, y blanco de muestra fortificada a diferentes niveles de concentración, para el aseguramiento de la calidad. Haciendo uso, además, de materiales de referencia certificados, y participando en ejercicios interlaboratorios suministrados por Quasimeme (Wageningen, Holanda), obteniendo resultados satisfactorios en ambos tipos de controles de calidad externos. Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia, acreditado por ENAC bajo un sistema de control de calidad establecido por la Norma UNE/EN-ISO/IEC 17025 (Asociación Española de Normalización UNE/EN-ISO/IEC 17025 2018).

2. ARTÍCULO CIENTÍFICO 4



Chemosphere

Volume 104, June 2014, Pages 7-14



Review

Probabilistic risk assessment of the exposure to polybrominated diphenyl ethers via fish and seafood consumption in the Region of Valencia (Spain)

Olga Pardo <sup>a, b, ✉</sup>, Maria Isabel Beser <sup>a, c</sup>, Vicent Yusà <sup>a, b, c</sup>, Joaquim Beltrán <sup>d</sup>

- <sup>a</sup> Centre for Public Health Research (CSISP-FISABIO), 21, Avenida Catalunya, 46020 Valencia, Spain
- <sup>b</sup> Analytical Chemistry Department, Universit of Valencia, Edifici Jeroni Muñoz, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain
- <sup>c</sup> Public Health Laboratory of Valencia, Spain
- <sup>d</sup> Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

HIGHLIGHTS

- PBDEs dietary intake obtained by probabilistic and deterministic approaches were compared.
- BDE-47 showed the highest levels in fish and seafood.
- Salmon, mackerel and swordfish were the most contaminated species.
- EFSA MOE approach was used for the risk characterization.
- Calculated MOEs do not indicate a health concern.

ARTICLE INFO

Article history:  
 Received 21 August 2013  
 Received in revised form 11 December 2013  
 Accepted 20 December 2013  
 Available online 15 February 2014

Keywords:  
 Dietary exposure  
 Dietary intake  
 Monitoring  
 Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)  
 Risk evaluation  
 Probabilistic risk assessment

ABSTRACT

The study was carried out to estimate the dietary intake of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the Region of Valencia (Spain) in order to evaluate the resultant risk. The PBDE levels in fish and seafood (a total of 206 samples) were determined. Dietary intake was estimated using results of PBDE analyses in fish and seafood marketed in the Region of Valencia over the period 2007–2012 and data of the first Valencian Food Consumption Survey, conducted in 2010. Two scenarios were assumed for left-censored results: the lower-bound (LB) scenario, in which unquantified results (below the limit of quantification (LOQ)) were set to zero and the upper-bound (UB) scenario, in which unquantified results were set to the LOQ and two approaches (deterministic and probabilistic) were compared. The mean PBDE concentration in fish and seafood from Valencian markets was between 0.97 and 3.87 ng g<sup>-1</sup> w.w. and was similar to that reported recently by European Food Safety Authority (EFSA). Among the analysed congeners, BDE-47 showed the highest levels and salmon, mackerel and swordfish were the most contaminated species. The average estimated daily intake of the sum of PBDEs (upper bound scenario; probabilistic approach) for adults and children were 0.137 ng kg<sup>-1</sup> body weight (b.w.) day and 0.180 ng kg b.w.<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, respectively. In relation to risk analysis, calculated margins of exposure (MOEs) for the BDE-47, -99 and -153 congeners for children and do not indicate a health concern with respect to current dietary exposure in the Valencian Region and only 0.05% of the adult population and a 0.1% of children could be in risk derived by BDE-99 intake through fish.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction .....	8
2. Materials and methods .....	8
2.1. Food sampling .....	8
2.2. Chemical analysis and QA/QC .....	8
2.3. Consumption data .....	10

\* Corresponding author at: Centre for Public Health Research (CSISP-FISABIO), 21, Avenida Catalunya, 46020 Valencia, Spain. Tel.: +34 961925784. E-mail address: pardo\_olj@gva.es (O. Pardo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.084>  
 0045-6535/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.



---

*Chemosphere, 104 (2014) 7 - 14*

## **Probabilistic risk assessment of the exposure to polybrominated diphenyl ethers via fish and seafood consumption in the Region of Valencia (Spain)**

Olga Pardo<sup>a, b</sup>, Maria Isabel Beser<sup>a, c</sup>, Vicent Yusà<sup>a, b, c, \*</sup>, Joaquim Beltrán<sup>d</sup>,

<sup>a</sup> Centre for Public Health Research (CSISP – FISABIO), Av. Catalunya, 21, 46020 Valencia, Spain

<sup>b</sup> Analytical Chemistry Department, University of Valencia, Edifici Jeroni Muñoz, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Spain

<sup>c</sup> Public Health Laboratory of Valencia, Spain

<sup>d</sup> Research Institute for Pesticides and Water, University Jaume I, Castellón, Spain

---

### **ABSTRACT**

The study was carried out to estimate the dietary intake of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the Region of Valencia (Spain) in order to evaluate the resultant risk. The PBDE levels in fish and seafood (a total of 206 samples) were determined. Dietary intake was estimated using results of PBDE analyses in fish and seafood marketed in the Region of Valencia over the period 2007 – 2012 and data of the first Valencian Food Consumption Survey, conducted in 2010. Two scenarios were assumed for left-censored results: the lower-bound (LB) scenario, in which unquantified results (below the limit of quantification (LOQ)) were set to zero and the upper-bound (UB) scenario, in which unquantified results were set to the LOQ and two approaches (deterministic and probabilistic) were compared. The mean PBDE concentration in fish and seafood from Valencian markets was between 0.97 and 3.87 ng g<sup>-1</sup> w.w. and was similar to that reported recently by European Food Safety Authority (EFSA). Among the analysed congeners, BDE-47 showed the highest levels and salmon, mackerel and swordfish were the most contaminated species. The average estimated daily intake of the sum of PBDEs (upper bound scenario; probabilistic approach) for adults and children were 0.137 ng kg<sup>-1</sup> body weight (b.w.) day and 0.180 ng kg b.w.<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>, respectively. In relation to risk analysis, calculated margins of exposure (MOEs) for the BDE-47, -99 and -153 congeners for children and do not indicate a health concern with respect to current dietary exposure in the Valencian Region and only 0.05% of the adult population and a 0.1% of children could be in risk derived by BDE-99 intake through fish.

**HIGHLIGHTS**

- PBDEs dietary intake obtained by probabilistic and deterministic approaches were compared.
- BDE-47 showed the highest levels in fish and seafood.
- Salmon, mackerel and swordfish were the most contaminated species.
- EFSA MOE approach was used for the risk characterization.
- Calculated MOEs do not indicate a health concern.

**Keywords:** Dietary exposure; Dietary intake; Monitoring, Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs); Risk evaluation; Probabilistic risk assessment.

**1. Introduction**

Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) are a class of brominated flame retardants (BFRs) widely used in a variety of polymer and plastics applications, as well as in a broad range of consumer products, and consequently have been produced in notable quantities (Alaee et al., 2003). Of the 209 possible PBDE congeners, 13 congeners are typically marketed as three historically used commercial mixtures named according to their average total bromine content, penta-BDE, octa-BDE and deca-BDE. Unfortunately, BFRs have proved to have environmental side-effects. PBDEs are persistent and bioaccumulate in the environment, and are prone to long range atmospheric transport (Kemmllein et al., 2009). Therefore, the congeners of PBDEs are widespread in the global environment from the manufacturing or waste disposal processes (Frederiksen et al., 2009). PBDEs have been found in environment, wildlife and humans (Wilford et al., 2005; Shaw et al., 2009; Medina et al., 2009; Yogui and Sericano, 2009). In recent years, strict bans have been imposed on the worldwide use of penta and octa-BDE formulations (European Parliament, 2003) and components of the penta-BDE and octa-BDE commercial mixtures have been added to the Persistent Organic Pollutants (POPs) list of Stockholm Convention (Ashton et al., 2009).

Due to the possibility of association of PBDEs with endocrine disruption, reproductive and developmental toxicity, neurotoxicity, and potential cancer, adverse effects that have been already reported in rodent studies, the increasing presence of PBDEs in human tissues is of great concern (Darnerud, 2003). In

addition, previous studies show that PBDEs levels in human specimens have suffered significant increases in the last years (Schechter et al., 2006; Gómara et al., 2007). Although human exposure to PBDEs could be by ingestion (through diet or dust), inhalation (indoor and outdoor air) or dermal absorption (consumer products and dust) (Frederiksen et al., 2009), it was hypothesized that the predominant route of human exposure to PBDEs was through dietary intake (Bocio et al., 2003). Being lipophilic and persistent organic compounds, PBDEs accumulate in lipid-rich tissues. Due to its bioaccumulation, fish is believed to be the main contributor of PBDEs in the diet (Domingo, 2012).

Two conflicting views regarding the importance of fish consumption in the human diet are presented in the literature. The main themes of the discussion are the benefits and risks stemming from fish consumption (Mozaffarian and Rimm, 2006; Domingo et al., 2007; Usyduš et al., 2009). Due to their nutritional value, fish are high quality foods; however, many authors point out that the contaminants occurring in them (e.g., dioxins, polychlorobypnyls and PBDEs) are a potential health hazard, and emphasize that the amount of these substances should be limited in the human diet (Domingo et al., 2007). At present, the levels of PBDEs in foods are not limited by legislation. Nonetheless, the risk stemming from the consumption of contaminated foods can be evaluated by comparing the estimated PBDEs daily intake deriving from the consumption of fish and seafood to benchmark doses. The EFSA Scientific Panel on contaminants in the food chain (CONTAM) derived benchmark doses (BMDs) for BDE-47, BDE-99 and BDE-153 (EFSA, 2011) and concluded that a MOE approach is appropriate for the PBDEs health risk assessment.

The aim of the current study was to calculate the intake of PBDEs resulting from the consumption of fish and seafood and to evaluate the health risk but also to compare the results obtained by the deterministic approach with those resulting from the probabilistic non-parametric approach, which has been growing interest internationally in recent years. Furthermore, this study follows the MOE approach recommended by EFSA (EFSA, 2011) using the body burden as starting point for the risk characterization. It should be highlighted that it is the first paper that use the probabilistic approach to calculate the PBDEs intake trough fish and seafood in Spain, comparing the results with those derived from the deterministic approach. In our knowledge it is also the first paper using the EFSA MOE approach for the risk characterization.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Food sampling**

Twenty-five fish and seafood species were selected based on the fish-consuming habits in Valencia (Table 1). A total of 206 samples were randomly acquired in 118 different local markets and supermarkets from the Region of Valencia, to ensure sufficient statistical power for data analysis. The sampling was carried out during 2007 – 2012 by inspectors from the Public Health Department and analysed in the Public Health Laboratory of Valencia. The samples were randomly purchased, not only of local origin. Upon shipping to the laboratory refrigerated, the samples were stored at -20 °C approximately until analysis.

### **2.2. Chemical analysis and QA/QC**

A detailed description of the chemicals, equipment, analytical methods, validation and analytical quality assurance procedures could be found in Supplementary data associated to this article (see Appendix). Briefly, PBDEs were extracted by pressurised liquid extraction and analysed by gas chromatography–tandem mass spectrometry after a clean-up by liquid–liquid extraction followed by a solid phase extraction purification. Some marked BDEs were used as internal standards.

BDE28, BDE47, BDE49, BDE66, BDE99, BDE100, BDE119, BDE139, BDE153, BDE154, BDE155 and BDE183 were analysed. BDE209 were not included in the analytical method because it suffered thermal degradation. To avoid this degradation, the use of shorter columns has been described (Besis and Samara, 2012) but unfortunately they were not available in the laboratory.

This laboratory has been accredited by the Spanish national body for accreditation (ENAC), and operates under the quality assurance system established by ISO/IEC 17025 (International Organization for Standardization/International Electrotechnical Commission, 2005).



**Table 1**  
Mean BDE concentrations (pg g wet weight<sup>-1</sup>) in fish and seafood samples collected in Valencian markets.

Species	BDE-28		BDE-47		BDE-49		BDE-66		BDE-99		BDE-100		BDE-119		BDE-133		BDE-154		BDE-155		BDE-183		Total PBDEs				
	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB			
Sardines and pilchard (Sardina)	0.0	10.0	10.7	20.4	0.0	10.0	10.0	0.0	10.0	10.6	20.2	10.9	20.5	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	32.2	151.1
Anchovy (Engraulis)	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	120.0
Salmon and trout (Salmo spp.) n = 11	54.7	62.4	55.3	63.1	45.1	54.6	46.9	54.7	52.8	60.7	56.6	64.3	60.7	56.6	64.3	60.7	56.6	64.3	60.7	56.6	64.3	60.7	56.6	64.3	60.7	56.6	472.8
Mackerel (Scomber) n = 8	0.0	10.0	45.5	55.1	0.0	10.0	0.0	10.0	44.5	54.0	46.7	56.2	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	136.7
Tuna (Thunnus) n = 12	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	120.0
Cod and whiting (Gadus spp.) n = 11	0.0	10.0	0.0	10.0	NA	NA	NA	NA	0.0	10.0	0.0	10.0	90.0	NA	NA	NA	0.0	10.0	0.0	10.0	NA	NA	0.0	10.0	0.0	10.0	150.0
Hake (Merluccius) n = 8	0.0	10.0	0.8	10.6	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.8
Plaice (Pleuronectes flesus) n = 6	0.0	10.0	90.0	90.0	NA	NA	NA	NA	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	NA	NA	0.0	10.0	0.0	10.0	NA	NA	0.0	10.0	0.0	10.0	90.0
Carp (Cyprinus) n = 7	0.0	10.0	6.7	16.3	0.0	10.0	0.0	10.0	6.2	15.8	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	12.8
Blue whiting (Micromesistius poutassou) n = 6	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0
Pagel (Pagellus erythrinus) n = 5	0.0	10.0	1.3	11.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	1.3
Swordfish (Xiphiidae spp.) n = 12	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	15.9	73.2	2.6	62.3	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	18.4
Monkfish (Lophius) n = 6	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0
Turbot (Scophthalmus maximus) n = 12	0.0	10.0	0.0	10.0	NA	NA	NA	NA	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	NA	NA	0.0	10.0	0.0	10.0	NA	NA	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0
Perch (Perca) n = 9	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0
Rays (Chondrichthyes) n = 6	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0
Whiting (Merluccius spp.) n = 8	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0
Trachurus (Trachurus trachurus) n = 12	0.0	10.0	5.4	15.5	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	5.5	15.7	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	10.9
Gilthead bream (Sparus auratus) n = 9	11.2	20.8	11.2	20.8	0.0	10.0	0.0	10.0	11.1	20.7	11.4	20.9	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	44.9
Sea bream (Pagellus spp.) n = 8	0.0	10.0	39.3	48.7	0.0	10.0	0.0	10.0	39.5	48.8	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	78.8
Pravms (Palaemon serratus) n = 5	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0
Squid (Loligo vulgaris) n = 8	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0
Octopus (Octopus vulgaris) n = 9	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0
Crab (Callinectes officinalis) n = 9	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0
Mussel (Mytilus edulis) n = 6	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0	10.0	0.0
Total	65.9	313.2	356.1	581.4	45.1	264.6	46.9	264.7	180.5	473.4	223.6	509.9	0.0	220.0	0.0	250.0	55.3	303.1	0.0	220.0	0.0	250.0	0.0	250.0	0.0	250.0	603.4

### **2.3. Consumption data**

A questionnaire-based dietary survey was conducted in 2010 in the same area from where fish and seafood samples were collected. Dietary data were collected through a 24-h recall in which 1478 subjects (195 children and 1281 adults) were asked to recall and describe the kinds and amounts of all foods and beverages ingested during a 24-h period. Dietary recalls were carried out in two waves in order to take into account the variation in the consumption patterns by the period of the year. In the present study, only the fish group was considered for further discussions due to previous studies demonstrate that the greatest contribution to PBDEs intake corresponds to fish and seafood (Kiviranta et al., 2004).

### **2.4. Occurrence in fish and seafood**

Results were not corrected by the recovery rate. The limit of reporting (LOR) was fixed to 0.01 ng g<sup>-1</sup>, corresponding to the LOQ value.

### **2.5. Dietary exposure assessment**

Dietary exposure was estimated based on the consumption data from our dietary survey and the analytical data from the present study.

Left-censored results (data below the quantification limit) were processed according to the World Health Organisation (WHO) recommendations (substitution method) that are widely used in food risk assessment (GEMS/Food-Euro, 1995; EFSA, 2010). For each congener, considering a censoring rate higher than 60%, the LB and the UB scenarios were assumed.

Exposures were estimated for adults (16 – 95 years and 71.2 kg b.w.) and children (6 – 15 years and 43.5 kg b.w.).

#### *2.5.1. Deterministic exposure assessment*

A deterministic assessment was performed, in a first attempt, to assess the dietary exposure of PBDEs in fish and seafood. Calculations were executed using Microsoft Excel 2003. Point-estimated daily intakes of PBDEs via fish and seafood were determined by multiplying the mean BDE concentration in a species by the mean, maximum or P95 percentiles of the consumption (Vromman et al., 2010). Deterministic estimations of exposure consider that PBDEs are continuously present at an average level. As these might cause an overestimation, an

additional probabilistic analysis was performed in order to allow a more details exposure assessment.

### 2.5.2. Probabilistic exposure assessment

Probabilistic techniques allow the distribution of intakes amongst multiple individuals in a specific population to be estimated, taking into consideration the variability in food consumption between and within individuals and in occurrence of contaminants in food commodities. This approach permits the exposure assessor to consider the whole distribution of exposure, from minimum to maximum, with all modes and percentiles (Kroes et al., 2002).

Numeric values for consumption and PBDE levels were employed. Calculations were executed using the software Crème Food<sup>®</sup>. The software is a Monte Carlo computational system for stochastic modelling of dietary exposure (McNamara et al., 2003). The basic calculation that is iterated within the Monte Carlo system is the simple calculation [Food amount] × [BDE concentration]. To model the intake as accurately as possible this calculation was repeated 100.000 times. The different possible outcomes generated iteratively were assembled to create a probabilistic statement about the range of results obtained.

## 2.6. Risk characterization

The Panel on contaminants in the food chain (CONTAM) set a BMDL<sub>10</sub> (lower 95% confidence limit for a benchmark response of 10%) for BDE-47, BDE-99 and BDE-153 (EFSA, 2011) and recommended a MOE approach using the body burden as starting point for the risk characterization.

By comparison of the calculated human dietary intake associated with the body burden at the BMDL ( $Dr,h$ ) with the estimated dietary intake for the general population or for specific subgroups of the population, the MOE can be calculated (EFSA, 2011), where  $MOE = Dr,h \text{ (amount kg b.w.}^{-1}) / \text{estimated dietary intake (amount kg b.w.}^{-1})$ .

Usually, in a traditional hazard characterization a default assessment factor of 2.5 (WHO, 1999) is applied to account for inter-species difference in toxicodynamics. This implies that in the case of PBDEs in principle any MOE larger than 2.5 indicate that there is unlikely to be a health concern.

## 2.7. Uncertainty analysis

The uncertainty due to sampling uncertainty of the input data (concentration and consumption) was estimated using bootstrap approach (EFSA, 2012). This uncertainty was expressed per exposure percentile as a 95% confidence interval.

Unquantifiable uncertainties associated with exposure assessment have been considered for the interpretation of the results.

**Table 2**

Deterministic assessment. Estimated daily intake (ng kg b.w.<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>) of PBDEs through seafood by the population of the Region of Valencia.

Congener	Adults				Children			
	Mean		P95		Mean		P95	
	LB	UB	LB	UB	LB	UB	LB	UB
BDE-28	0.002	0.008	0.006	0.026	0.002	0.009	0.008	0.034
BDE-47	0.055	0.058	0.171	0.179	0.060	0.063	0.223	0.234
BDE-49	0.007	0.014	0.021	0.045	0.007	0.016	0.028	0.058
BDE-66	0.001	0.008	0.003	0.026	0.001	0.009	0.004	0.034
BDE-99	0.014	0.022	0.044	0.067	0.016	0.023	0.058	0.087
BDE-100	0.010	0.017	0.031	0.053	0.011	0.019	0.041	0.070
BDE-119	0.000	0.008	0.000	0.024	0.000	0.008	0.000	0.031
BDE-139	0.000	0.008	0.000	0.024	0.000	0.008	0.000	0.031
BDE-153	0.003	0.011	0.011	0.034	0.004	0.012	0.014	0.045
BDE-154	0.001	0.008	0.002	0.025	0.001	0.009	0.002	0.033
BDE-155	0.000	0.008	0.000	0.024	0.000	0.008	0.000	0.031
BDE-183	0.000	0.008	0.000	0.024	0.000	0.008	0.000	0.031
Total	0.093	0.178	0.389	0.551	0.101	0.196	0.377	0.720

b.w.: Body weight.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Concentration of PBDEs in fish and seafood

The average concentrations (mean) of the 12 PBDE congeners in the different fish and seafood species acquired in the Region of Valencia during 2007 – 2012 are reported in Table 1 while comments to them are shown in Supplementary data associated to this article (see Appendix). To accurately model non detects, two scenarios were assumed (LB and the UB).

### **3.2. Evaluation of dietary exposure**

In Tables 2 and 3 dietary exposure to PBDEs (lower bound and upper bound scenarios) through fish and seafood for adults (from 16 to 95 years and 71.2 kg b.w.) and children (from 6 to 15 years and 43.5 kg b.w.) is presented for the deterministic and probabilistic approach, respectively.

As can be seen, the results obtained using the probabilistic approach were similar to those reported using the deterministic model although in some cases they are slightly lower. Therefore, data resulting from the probabilistic assessment were used for future discussions and for risk characterization considering that they permit to take into account the whole distribution of exposure. The highest mean dietary exposure was due to BDE-47 (0.039 – 0.064 ng kg b.w.<sup>-1</sup>), result that is according to that reported by EFSA (EFSA, 2011). On the other hand, BDE-49 mean dietary exposure ranged from 0.007 to 0.022 ng kg b.w.<sup>-1</sup>, the highest exposure after BDE-47.

**Table 3.** Probabilistic assessment. Estimated daily intake ( $\text{ng} \cdot \text{kg} \cdot \text{b} \cdot \text{w}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) of PBDEs through seafood by the population of the Region of Valencia.

Model	P90		P95		P99			
	Mean	LB	UB	LB	UB	LB	UB	
<i>Children</i>								
BDE-28	0.001 (0.001-0.003)	0.008 (0.006-0.011)	0.001 (0-0.002)	0.032 (0.021-0.043)	0.003 (0.002-0.005)	0.048 (0.034-0.054)	0.010 (0.001-0.016)	0.065 (0.053-0.066)
BDE-47	0.059 (0.029-0.081)	0.064 (0.033-0.083)	0.054 (0.021-0.077)	0.062 (0.051-0.083)	0.142 (0.085-0.232)	0.153 (0.089-0.226)	0.692 (0.364-1.270)	0.692 (0.34-1.27)
BDE-49	0.014 (0.005-0.024)	0.022 (0.01-0.032)	0.004 (0.001-0.007)	0.034 (0.026-0.045)	0.012 (0.008-0.019)	0.051 (0.037-0.055)	0.075 (0.035-0.96)	0.083 (0.056-1.17)
BDE-66	0.001 (0-0.001)	0.007 (0.005-0.009)	0 (0-0.001)	0.032 (0.021-0.042)	0.001 (0.001-0.002)	0.048 (0.034-0.054)	0.005 (0.003-0.007)	0.065 (0.053-0.066)
BDE-99	0.013 (0.006-0.022)	0.017 (0.012-0.027)	0.008 (0.002-0.015)	0.041 (0.032-0.051)	0.025 (0.015-0.039)	0.054 (0.044-0.061)	0.116 (0.062-0.269)	0.123 (0.07-0.269)
BDE-100	0.013 (0.007-0.022)	0.020 (0.012-0.028)	0.007 (0.002-0.014)	0.042 (0.030-0.051)	0.024 (0.013-0.044)	0.055 (0.047-0.06)	0.331 (0.063-0.346)	0.331 (0.07-0.346)
BDE-119	0 (0-0)	0.006 (0.004-0.009)	0 (0-0)	0.032 (0.020-0.042)	0 (0-0)	0.048 (0.034-0.054)	0 (0-0)	0.065 (0.053-0.066)
BDE-139	0 (0-0)	0.006 (0.004-0.009)	0 (0-0)	0.032 (0.020-0.042)	0 (0-0)	0.048 (0.034-0.054)	0 (0-0)	0.065 (0.053-0.066)
BDE-153	0.003 (0.001-0.004)	0.009 (0.006-0.012)	0.002 (0-0.003)	0.032 (0.023-0.043)	0.005 (0.003-0.008)	0.048 (0.035-0.054)	0.018 (0.012-0.024)	0.065 (0.053-0.066)
BDE-154	0 (0-0)	0.007 (0.005-0.009)	0 (0-0.001)	0.032 (0.021-0.042)	0.001 (0.001-0.001)	0.048 (0.034-0.054)	0.003 (0.002-0.004)	0.065 (0.053-0.066)
BDE-155	0 (0-0)	0.006 (0.004-0.009)	0 (0-0)	0.032 (0.021-0.042)	0 (0-0)	0.048 (0.034-0.054)	0 (0-0)	0.065 (0.053-0.066)
BDE-183	0 (0-0)	0.007 (0.005-0.009)	0 (0-0)	0.032 (0.021-0.042)	0 (0-0)	0.048 (0.034-0.054)	0 (0-0)	0.065 (0.053-0.066)
Total	0.103 (0.054-0.148)	0.180 (0.115-0.244)	0.127 (0.075-0.185)	0.536 (0.332-0.654)	0.315 (0.181-0.619)	0.722 (0.571-0.957)	2.225 (0.826-3.164)	2.695 (1.113-3.682)
<i>Adults</i>								
BDE-28	0.001 (0.001-0.001)	0.007 (0.006-0.008)	0.001 (0.001-0.001)	0.025 (0.023-0.027)	0.003 (0.002-0.003)	0.033 (0.03-0.035)	0.008 (0.007-0.009)	0.053 (0.048-0.066)
BDE-47	0.039 (0.033-0.048)	0.045 (0.039-0.054)	0.065 (0.053-0.076)	0.070 (0.062-0.084)	0.144 (0.124-0.166)	0.147 (0.132-0.175)	0.574 (0.414-0.736)	0.584 (0.427-0.752)
BDE-49	0.007 (0.005-0.01)	0.013 (0.010-0.015)	0.005 (0.004-0.0056)	0.026 (0.024-0.028)	0.011 (0.01-0.013)	0.034 (0.032-0.037)	0.039 (0.033-0.057)	0.067 (0.056-0.072)
BDE-66	0.001 (0-0.001)	0.006 (0.005-0.007)	0.001 (0-0.001)	0.024 (0.021-0.026)	0.001 (0.001-0.002)	0.032 (0.029-0.033)	0.004 (0.003-0.004)	0.054 (0.048-0.064)
BDE-99	0.008 (0.006-0.009)	0.014 (0.012-0.015)	0.01 (0.007-0.012)	0.031 (0.029-0.033)	0.023 (0.02-0.026)	0.043 (0.039-0.046)	0.076 (0.064-0.084)	0.085 (0.076-0.097)
BDE-100	0.01 (0.008-0.012)	0.015 (0.013-0.018)	0.01 (0.008-0.012)	0.031 (0.029-0.033)	0.026 (0.021-0.035)	0.047 (0.041-0.053)	0.214 (0.175-0.276)	0.215 (0.179-0.263)
BDE-119	0 (0-0)	0.006 (0.005-0.006)	0 (0-0)	0.023 (0.021-0.026)	0 (0-0)	0.031 (0.029-0.033)	0 (0-0)	0.052 (0.047-0.059)
BDE-139	0 (0-0)	0.006 (0.005-0.006)	0 (0-0)	0.023 (0.021-0.026)	0 (0-0)	0.031 (0.029-0.033)	0 (0-0)	0.052 (0.047-0.059)
BDE-153	0.002 (0.001-0.003)	0.008 (0.007-0.009)	0.002 (0.002-0.003)	0.026 (0.023-0.028)	0.005 (0.004-0.006)	0.033 (0.030-0.035)	0.014 (0.013-0.015)	0.053 (0.048-0.064)
BDE-154	0 (0-0)	0.007 (0.006-0.007)	0 (0-0)	0.025 (0.023-0.027)	0.001 (0.001-0.001)	0.032 (0.030-0.034)	0.002 (0.002-0.003)	0.053 (0.048-0.066)
BDE-155	0 (0-0)	0.006 (0.005-0.006)	0 (0-0)	0.023 (0.021-0.026)	0 (0-0)	0.031 (0.029-0.033)	0 (0-0)	0.052 (0.047-0.059)
BDE-183	0 (0-0)	0.006 (0.005-0.007)	0 (0-0)	0.025 (0.023-0.027)	0 (0-0)	0.032 (0.030-0.034)	0 (0-0)	0.052 (0.047-0.064)
Total	0.068 (0.057-0.082)	0.137 (0.124-0.158)	0.127 (0.111-0.147)	0.379 (0.349-0.407)	0.267 (0.220-0.322)	0.569 (0.496-0.649)	1.210 (0.846-1.499)	1.587 (1.169-1.048)

The mean estimated daily intake of the sum of PBDEs (upper bound concentration) for adults and children were  $0.137 \text{ ng kg b.w.}^{-1} \text{ d}^{-1}$  and  $0.180 \text{ ng kg b.w.}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectively. This difference between estimated daily intakes (EDIs) of children and adults can be explained by differences on body weights and by the different fish and seafood consumption patterns for different age groups.

It should be highlighted that although it is well known (EFSA, 2011) that BDE-209 is a great contributor to the dietary intake, after BDE-47, it has not been analysed in this work and therefore it has not been taken into account in the estimated daily intake of the sum of PBDEs. Nevertheless, we should consider that CONTAM Panel concluded that BDE-209 dietary exposure in the EU does not raise a health concern.

A comparison of the estimated daily intake with other PBDE intakes through fish and seafood obtained in some other European countries could be found in Supplementary data associated to this article (see Appendix).

To identify the fish and seafood that contributed the most to PBDE dietary exposure, the average contribution of each species to overall exposure was determined. Salmon (*Salmo* spp.), mackerel (*Scomber* spp.) and swordfish (*Xiphidae* spp.) are the main contributors, about 20% each one to the total PBDE dose, due to high contamination levels and high patterns of consumption. Although lean marine species such as cod or hake contained often low PBDE levels (Voorspoels et al., 2007; Domingo et al., 2008), the consumption by population of the Region of Valencia is important and this supposes a contribution to overall exposure of about 15% and 11% respectively. Finally, sardine (*Sardina* spp.) and gilthead bream (*Sparus auratus*) mean the 10% and the 4% of the PBDEs total intake through fish and seafood.

**Table 4.** Margins of exposure (MOEs) for BDE-47, -99 and -153, for different population groups, based on the lower bound (LB) and upper bound (UB) scenarios of the dietary intake.

Exposed population	PBDE congeners														
	BDE-47			BDE-99			BDE-153								
	Estimated intake (ng kg <sup>-1</sup> b.w.)	Dr,h (ng kg <sup>-1</sup> b.w.)	MOE	Estimated intake (ng kg <sup>-1</sup> b.w.)	Dr,h (ng kg <sup>-1</sup> b.w.)	MOE	Estimated intake (ng kg <sup>-1</sup> b.w.)	Dr,h (ng kg <sup>-1</sup> b.w.)	MOE	Estimated intake (ng kg <sup>-1</sup> b.w.)	Dr,h (ng kg <sup>-1</sup> b.w.)	MOE			
	LB	UB		LB	UB		LB	UB		LB	UB	LB	UB		
Children (6-15 years), average consumers	0.059	0.064	172	2915	2688	0.013	0.017	4.2	323	247	0.003	0.009	9.6	3200	1067
Children (6-15 years), high consumers	0.692	0.692	172	249	249	0.116	0.123	4.2	36	34	0.018	0.065	9.6	533	148
Adults (16-95 years), average consumers	0.039	0.045	172	4410	3822	0.008	0.014	4.2	525	300	0.002	0.008	9.6	4800	1200
Adults (16-95 years), high consumers	0.574	0.584	172	300	295	0.076	0.085	4.2	55	49	0.014	0.053	9.6	686	181



### 3.3. Risk characterization

Estimated MOE for average and high consumers, and for adults (from 16 to 95 years and 71.2 kg b.w.) and children (from 6 to 15 years and 43.5 kg b.w.) are shown in Table 4.

Calculated MOEs for the BDE-47, -99 and -153 congeners for children and adults are all larger than 2.5. In conclusion, the MOEs do not indicate a health concern with respect to current dietary exposure in the Valencia Region.

On the other hand, as the outputs generated by probabilistic approaches are probability functions (see probability density function (PDF) and cumulative density functions (CDF) for children and adults, UB scenario, in Appendix), the percentage of population that could be in risk can be obtained. In this case, setting the MOE to 2.5 (critical value), the critical dietary intake (above which could be a health concern) can be calculated, where:

Critical dietary intake (amount kg b.w.<sup>-1</sup>) =  $D_r, h$  (amount kg b.w.<sup>-1</sup>) / MOE

and compared with the estimated probability function of the dietary intake obtained from the probabilistic assessment. This has been made with the Limit Analysis tool available in the Crème Food<sup>®</sup> software. The results obtained are shown in Table 5. As can be seen only 0.05% of the adult population (2140 consumers) and a 0.1% of children (498 consumers) could be in risk derived by BDE-99 intake through fish and seafood. It should be highlighted that this calculation has been made in the UB or pessimistic scenario, which tend to overestimate the intake (Nougadère et al., 2011).

### 3.4. Uncertainty related to exposure assessment

Dietary exposure assessments are affected by scientific uncertainties which need to be considered for the interpretation of results. Dietary consumption surveys as the 24-h recall used in this study are prone to random, not systematic errors. Several other parameters can also affect the uncertainty of the calculated exposure. These include the use of variability or processing factors, replacing the level assigned to results below LOR and uncertainty in the analytical results. Variability factors, that usually give rise to higher exposure levels, have not been used in this study. On the other hand, the high proportion of samples having levels below the LOR may have introduced uncertainties to overall estimate. It has been reported that pessimistic model runs (that replace values below the

LOR with the LOR) use assumptions that are expected to lead to an over-estimation of the exposure, whereas optimistic model runs (that replace values below the LOR with the zero) use assumptions that are expected to lead to lower estimates of the exposure (EFSA, 2012).

**Table 5.**

% of population with EDI above the critical dietary intake for adults and children, based on maximum upper bound (UB) of the estimated daily intake ( $\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{b.w}\cdot\text{d}$ ).

<b>Congener</b>	<b>Critical dietary intake (<math>\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{b.w}\cdot\text{d}</math>)</b>	<b>% Of population with EDI&gt;critical dietary intake</b>	<b>Population excess<sup>a</sup></b>
<i>Adults</i>			
BDE 47	68.80	0	0
BDE 99	1.68	0.05	2140
BDE 153	3.84	0	0
<i>Children</i>			
BDE 47	68.80	0	0
BDE 99	1.68	0.1	498
BDE 153	3.84	0	0

EDI: Estimated daily intake.

<sup>a</sup>Based on adult population in the Valencian Region of 5129622 and children population of 497792.

On the other hand, BDE-209 has not been analysed in this study. Therefore, including this congener, the estimated daily intake would have been higher.

In addition, processing factors have not been used in the present study. So if a processing factor had been applied, the estimated exposure would have been lower. As PBDEs are chemically stable lipophilic substances, reduction of their content in processed foods (e.g. cooked food) is mainly caused by loss of fat rather than degradation.

It should be also stated that we present the results of a monitoring study on the levels of PBDE congeners from 2007 to 2012 in different fish and seafood species, and not the results derived from a total diet studies that seem to be more appropriate in risk assessment studies and that the purpose here is not to evaluate the total diet exposure, but only to determine the intake of PBDEs from fish and seafood.

#### 4. Conclusions

The average estimated daily intake of the sum of PBDEs through fish and seafood (upper bound concentration; probabilistic approach) for adults and children were  $0.142 \text{ ng kg b.w.}^{-1} \text{ d}^{-1}$  and  $0.186 \text{ ng kg b.w.}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectively. Only 0.05% of the adult population and a 0.1% of children could be in risk derived by BDE-99 intake through fish.

Although the main human exposure to PBDEs is through the consumption of fish products (Bragigand et al., 2006), it should be highlighted that for the total PBDEs daily intake must be taken into account other external exposure routes as dust, other exposures via diet (meat products and eggs, dairy products and oils, vegetables, etc.) and air. On the other hand, the analysis of BDE-209 should be considered in future works since it has been described by EFSA as a great contributor to the dietary intake and processing factor should be also included in order to avoid the overestimation of the PBDEs intake.

Deterministic approach has led to estimated intakes similar to those obtained by probabilistic approach (slightly lower). Nevertheless, more realism is introduced using probabilistic approach because it allows the distribution of intakes amongst multiple individuals in a specific population to be estimated, taking into consideration the variability in food consumption between and within individuals and in occurrence of residues in food commodities (Kroes et al., 2002). Therefore, future investigations will be done with this last methodology.

#### Acknowledgements

The authors are grateful to all inspectors of the Public Health Department of Valencia Regional Government who participated in the monitoring programme. They also thank the technicians of the Public Health laboratory of Valencia, Spain.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.084>.

---

**References**

- Alaee, M., Arias, P., Sjödin, A., Bergman, A., 2003. An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environ. Int.* 29, 683–689.
- Ashton, M., Kantai, T., Kohler, P.M., Roemer-Mahler, A., Templeton, J., 2009. Summary of the Fourth Conference of the Parties to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants: 4–8 May 2009. <<http://chm.pops.int/Programmes/NewPOPs/The9newPOPs/tabid/672/language/en-US/Default.aspx>>.
- Besis, A., Samara, C., 2012. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the indoor and outdoor environments – a review on occurrence and human exposure. *Environ. Pollut.* 169, 217–229.
- Bocio, A., Llobet, J.M., Domingo, J.L., Corbella, J., Teixidó, A., Casas, C., 2003. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: human exposure through the diet. *J. Agr. Food Chem.* 51, 3191–3195.
- Bragigand, V., Miard-Triquet, C., Parlier, E., Boury, P., Marchand, P., El Hourch, M., 2006. Influence of biological and ecological factors on the bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers in aquatic food webs from French estuaries. *Sci. Total Environ.* 368, 615–626.
- Darnerud, P.O., 2003. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environ. Int.* 29, 841–853.
- Domingo, J.L., 2012. Polybrominated diphenyl ethers in food and human dietary exposure: a review of the recent scientific literature. *Food Chem. Toxicol.* 450, 238–249.
- Domingo, J.L., Bocio, A., Falo, G., Llobet, J.M., 2007. Benefits and risks of fish consumption. Part I. A quantitative analysis of the intake of omega-3 fatty acids and chemical contaminants. *Toxicology* 230, 219–226.
- Domingo, J.L., Martí-Cid, R., Castell, V., Llobet, J.M., 2008. Human exposure to PBDEs through the diet in Catalonia, Spain: temporal trend: a review of recent literature on dietary PBDE intake. *Toxicology* 248, 25–32.

- European Food Safety Authority (EFSA), 2010. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *EFSA J.* 8, 1557.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2011. Scientific opinion on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in food. *EFSA J.* 9, 2156.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2012. Guidance on the use of probabilistic methodology for modelling dietary exposure to pesticide residues. *EFSA J.* 10, 2839.
- European Parliament and Council, 2003. Directive 2003/11/EC of the European Parliament and Council on the restriction of marketing and use of certain hazardous materials and preparations (octabromodiphenylether, pentabromodiphenylether). *OJ. C. L* 042, 45.
- Frederiksen, M., Vorkamp, K., Thomsen, M., Knudsen, L.E., 2009. Human internal and external exposure to PBDEs – a review of levels and sources. *Int. J. Hyg. Environ Health* 212, 109–134.
- Global environment monitoring system – food contamination monitoring and assessment programme (GEMS/Food), 1995. Reliable Evaluation of Low-Level Contamination of Food – Workshop in the Frame of GEMS/Food-EURO. Kulmbach, Germany, 26–27 May.
- Gómara, B., Herrero, L., González, M.J., 2007. Feasibility of electron impact and electron capture negative ionisation mass spectrometry for the trace determination of tri- to deca-brominated diphenyl ethers in human samples. *Anal. Chim. Acta* 597, 121–128.
- Kemmlin, S., Herzke, D., Law, R.J., 2009. Brominated flame retardants in the European chemicals policy of REACH-Regulation and determination in materials. *J. Chromatogr. A* 1216, 320–333.
- Kiviranta, H., Ovaskainen, M.A.L., Vartiainen, T., 2004. Market basket study on dietary intake of PCDD/Fs, PCBs, and PBDEs in Finland. *Environ. Int.* 30, 923–932.
- Kroes, R., Müller, D., Lambe, J., Löwik, M.R.H., van Klaveren, J., Kleiner, J., Massey, R., Mayer, S., Urieta, I., Verger, P., Visconti, A., 2002. Assessment of intake from the diet. *Food Chem. Toxicol.* 40, 327–385.

- McNamara, C., Naddy, B., Rohan, D., Sexton, J., 2003. Design, development and validation of software for modelling dietary exposure to food chemicals and nutrients. *Food Addit. Contam.* 20, S8–S26.
- Medina, C.M., Pitarch, E., Portolés, T., López, F.J., Hernández, F., 2009. GC-MS/MS multi-residue method for the determination of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in human breast tissues. *J. Sep. Sci.* 32, 2090–2102.
- Mozaffarian, D., Rimm, E.B., 2006. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA* 296, 1885–1899.
- Nougadère, A., Reninger, J.-C., Volatier, J.-L., Leblanc, J.-C., 2011. Chronic dietary risk characterization for pesticide residues: a ranking and scoring method integrating agricultural uses and food contamination data. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1484–1510.
- Schechter, A., Harris, T.R., Tung, C., Musumba, A., Olson, J., Birnbaum, L., 2006. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) levels in an expanded market basket survey of U.S. Food and estimated PBDE dietary intake by age and sex. *Environ. Health Perspect.* 114, 1515–1520.
- Shaw, S.D., Berger, M.L., Brenner, D., Kurunthachalam, K., Lohmann, N., Päpke, O., 2009. Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in the northwest Atlantic marine food web. *Sci. Total Environ.* 407, 3323–3329.
- Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Polak-Juszczak, L., Komar, K., Adamczyk, M., Melasa-Cieciewicz, M., Ruczynska, W., 2009. Fish products available in polish market – assessment of the nutritive value and human exposure to dioxins and other contaminants. *Chemosphere* 74, 1420–1428.
- Voorspoels, S., Covaci, A., Neels, H., Schepens, P., 2007. Dietary PBDE intake: a market-basket study in Belgium. *Environ. Int.* 33, 93–97.
- Vromman, V., Waegeneers, N., Cornelis, C., De Boosere, I., Van Holderbeke, M., Vinkx, C., et al., 2010. Dietary cadmium intake by the Belgian adult population. *Food Addit. Contam. A* 27, 1665–1673.

WHO (World Health Organisation), 1999. Environmental Health Criteria 210, Principles for the assessment of risk to human health from exposure to chemicals, WHO, Geneva, Switzerland.

Wilford, B.H., Shoeib, M., Harner, T., Zhu, J., Jones, K.C., 2005. Polybrominated diphenyl ethers in indoor dust in Ottawa, Canada: implications for sources and exposure. *Environ. Sci. Technol.* 39, 7027–7035.

Yogui, G.T., Sericano, J.L., 2009. Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the U.S. marine environment: a review. *Environ. Int.* 25, 655–666.

---

## Appendix A. Supplementary Material

### Chemical analysis and QA/QC

#### 1. Standards and solvents

All solvents were for residue analysis. Isooctane and sulphuric acid were supplied by Panreac (Barcelona, Spain) whereas n-hexane and anhydrous sodium sulphate were from Scharlau (Barcelona, Spain). Diatomaceous earth was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and Strata silica solid phase extraction (SPE) cartridges (500 mg 6 ml<sup>-1</sup>) were from Phenomenex (Macclesfield, UK).

Individual standards of BDE28, BDE47, BDE49, BDE66, BDE99, BDE100, BDE119, BDE139, BDE153, BDE154, BDE155 and BDE183 and internal standards [<sup>13</sup>C]BDE28, [<sup>13</sup>C]BDE47, [<sup>13</sup>C]BDE99 and [<sup>13</sup>C]BDE153 (50 µg ml<sup>-1</sup> in isooctane each one) were provided by Wellington Laboratories (Guelph, ON, Canada). The purities of all standards were more than 95%.

#### 2. Equipment

Lipid extractions were carried out using an accelerated solvent extraction system (ASE 350, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) equipped with 34 ml stainless steel extraction cells. A Turbo Vap 500 (Zymark, Idstein, Germany) was used for evaporation and concentration of the extracts.

Tandem mass spectrometry (MS–MS) analysis was performed on a Finnigan ion trap mass spectrometer PolarisQ (Austin, TX, USA). The mass spectrometer was connected by a heated transfer line to a Thermoquest Trace GC 2000 (Waltham, MA, USA) gas chromatograph equipped with a Combi Pal autosampler from CTC Analytics AG (Zwingen, Switzerland). Xcalibur 1.2 was used for data acquisition. The analysis were carried out with a 30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness TR-5MS capillary column (Thermo) using He as carrier gas. The column was directly connected to a programmed temperature vaporizing (PTV) injector. The liner used was a PTV–large volume (LV) 2.75×2 TRC from Thermo Finnigan (Milano, Italy).

#### 3. Sample preparation

About 1 kg of fish muscle of seafood was scrunched and homogenised (Ultra-Turrax TR-50, Germany). A portion of 200 g approximately was lyophilised and



an analytical aliquot of about 6 g was fortified with internal standards and extracted by pressurised liquid extraction (PLE).

#### *4. PLE extraction*

The analytical aliquot was mixed with diatomaceous earth and the sample was introduced into a 34 ml stainless-steel cell (containing a cellulose filter in the cell outlet). After closing, the sample cell was placed in the carousel of the ASE 350 system.

The extraction conditions were: Oven temperature of 100 °C, hexane as extraction solvent, 5 min heat-up time under a pressure of 1500 psi and three static cycles with a static time of 5 min. A volume equivalent to 20% of the extraction cell capacity was selected as flush volume. After the extraction a purge using pressurised nitrogen during 1 min was established. The resultant extract (30 ml approximately) was dried with 5 g of anhydrous sodium sulphate and the supernatant was collected and evaporated under a gentle N<sub>2</sub> stream at 40 °C with Turbo Vap 500 to 3 ml approximately.

#### *5. Clean up*

The procedure consists of a slightly modified SPE clean up previously developed by other authors (Medina et al. 2008 and Medina et al. 2009). The 3 ml extract was digested with about 1 ml of concentrated H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (added drop by drop), shaking for 1 min with a vortex. After, it was centrifuged for 5 min at 4000 rpm. The upper organic phase was collected and the aqueous acid phase was extracted twice more with 3 ml of hexane. The final extract was transferred into a 10 ml volumetric flask and diluted to volume with hexane.

A 2-ml aliquot was passed through a silica SPE cartridge previously conditioned with 5 ml of hexane. The first 1 ml was discarded and the following volume was collected and combined with an additional fraction obtained by passing through 1.5 ml more of hexane. The final extract was concentrated to dryness under a gentle nitrogen stream at 40 °C and redissolved in 0.5 ml of isoctane.

#### *6. Gas chromatography - tandem mass spectrometry (GC-MS/MS)*

The oven temperature program was programmed from 80 °C (held for 1.50 min) to 140 °C (held for 1.50 min) at a rate 50 °C min<sup>-1</sup>, then to 220 °C (held for 1 min) at 20 °C min<sup>-1</sup>, after to 280 °C (held for 10 min) at 2 °C min<sup>-1</sup> and finally to

300 °C (held for 5 min) at 30 °C min<sup>-1</sup>. MS-MS conditions and PTV-LV operating conditions were optimised in a previous research (Yusà et al. 2006).

### *7. Method validation and analytical quality assurance*

The analytical method was validated and the main performance characteristics of the method were: limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 4 and 12.5 ng kg<sup>-1</sup> wet weight (w.w.) respectively; recoveries from 83 to 106% and coefficient of variation ranging from 5 to 12%.

All test batches were analysed under quality-assurance protocols, including duplicate samples, reagent blanks and spiked samples. The analytical results of certified reference materials were in good agreement with the reference values and the laboratory participates regularly in laboratory proficiency testing provided by Quasimeme (Wageningen, The Netherlands), with satisfactory z-scores.

### **Concentration of PBDEs in fish and seafood**

Studies on PBDE in the environment have revealed that different profiles are found in biota and abiotic environment compartments, and that they are influenced by local point-sources, especially in the case of abiotic samples (Law et al. 2006). The PBDE patterns observed in fish and seafood are usually dominated by penta-mix formulation related congeners (de Wit, 2002; Law et al., 2006). This could reflect the fact that debromination of higher congeners can occur in the environment. The congeners analysed in the current work were constituents of the commercial pentaBDE mixture (BDE-47, BDE-99, BDE-100, BDE-153 and BDE-154) and octaBDE formulation (BDE-183). As can be shown in Table 1 of the main body, BDE-47 was, in general, predominant among the other congeners studied (mean LB and UB levels of 0.35 and 0.58 ng g wet weight<sup>-1</sup> (w.w.), respectively) and its contribution (percentage on total average) is between 14 and 37% approximately of total PBDEs. The share of penta-congeners (99 and 100) and the share of hexa-congeners (PBDE-153 and 154) accounted for 24 - 42% and 6 - 14%, respectively. Similar profiles were found in other studies carried out with fishes from the Mediterranean Sea (Pena-Abaurrea et al 2009) or from the Pacific Ocean (Hites et al. 2004) and in a total diet study carried out in Catalonia, Spain (Domingo et al. 2008). Moreover, in a recent European scientific opinion on PBDEs in food (EFSA, 2011), in which data from the analysis of PBDE congeners in food from 11 European countries were

reported, was shown that the highest levels in the food category "Fish and other seafood" were found for BDE-47 (1.30 - 1.32 ng g w.w.<sup>-1</sup>) followed by BDE-100 (0.33 - 0.36 ng g w.w.<sup>-1</sup>). Although a similar profile has been reflected in the present study, slightly lower concentrations were reported in the fish and seafood collected in the Region of Valencia (0.35 - 0.58 ng g w.w.<sup>-1</sup> for BDE-47) followed by BDE-100 (0.33 - 0.36 ng g w.w.<sup>-1</sup>).

There is an extensive amount of data reported in the literature on levels in fish and seafood worldwide. When compared with similar studies conducted in other countries or regions recently, the mean PBDE concentrations in fish and seafood from Valencian markets (0.97 - 3.87 ng g w.w.<sup>-1</sup>) were similar to those reported by EFSA (1.75 - 2.62 ng g w.w.<sup>-1</sup>, EFSA 2011) or by the United States (1.73 ng g w.w.<sup>-1</sup>, Schecter et al. 2004), but higher than those reported in previous Spanish Studies (0.34 ng g w.w.<sup>-1</sup>, Bocio et al. 2003; 0.56 ng g w.w.<sup>-1</sup>, Domingo et al. 2008), or those presented by other countries such as Japan (0.01 - 1.16 ng g w.w.<sup>-1</sup> from Inland Sea of Seto, Akutsu et al. 2001; 0.2 - 1.720 ng g w.w.<sup>-1</sup> from Osaka, Ohta et al. 2002), Norway (0.85 ng g w.w.<sup>-1</sup>, Kiviranta et al. 2004), Switzerland (0.74 - 1.3 ng g w.w.<sup>-1</sup>, Zennegg et al., 2003), Sweden (0.63 ng g w.w.<sup>-1</sup>, Darnerud, 2006), Canada (0.18 - 1.6 ng g w.w.<sup>-1</sup>, (Tittlemier et al., 2004), Belgium (0.45 ng g w.w.<sup>-1</sup>, Voorspoels et al., 2007) or China (0.15 - 0.23 ng g w.w.<sup>-1</sup>, Xiang 2007).

It has been suggested that differences in the total concentrations of PBDEs among different fish and seafood species are influenced by metabolic differences, age, and lipid content (Ohta et al., 2002). Fatty fish generally contain higher levels than lean fish (Leblanc et al., 2006; Bakker et al., 2008). In the present study, salmon was characterised by the highest levels of contaminants (0.37 - 0.47 ng g w.w.<sup>-1</sup>), followed by mackerel (0.14 - 0.26 ng g w.w.<sup>-1</sup>), swordfish (0.18 - 0.24 ng g w.w.<sup>-1</sup>), sea bream (0.08 - 0.20 ng g w.w.<sup>-1</sup>) and gilthead bream (0.04 - 0.16 ng g w.w.<sup>-1</sup>). These results are, in general, according with the results reported recently by EFSA (EFSA, 2011), in which PBDE levels were related with the fat content of the different fish species. Salmon and mackerel are characterised for their high contents of fat (about 11 - 12%). In salmon, PBDE levels determined in the current study were lower than those measured in salmon from the Baltic Sea (2.5 ng g w. w.<sup>-1</sup>) (Szlinder-Richert et al. 2010) but significantly higher than those in salmon caught in Alaska in 2000, in which BDE-47 concentration ranged from 0.03 to 0.3 ng g w. w.<sup>-1</sup> (Easton et al. 2002). In

tuna, PBDE concentrations found were lower to those reported by Domingo et al, 2006 in tuna samples from Catalonian supermarkets (0.07 - 1.05 ng g w.w.<sup>-1</sup>). Nevertheless, swordfish has a fat content of about 4% and the present study reveals PBDE contaminations levels of 0.24 ng g w.w.<sup>-1</sup>. Therefore, swordfish seems not to follow the general pattern that related PBDE levels with fat content. PBDE levels in swordfish are lower than those reported by Domingo et al., 2008, that informed levels of 0.98 ng g w.w.<sup>-1</sup>. Nevertheless, it has been observed that only few studies include swordfish for PBDE analysis, and the last scientific opinion on PBDEs in Food from EFSA (EFSA, 2011) in which several fish species were included, swordfish levels were not reported.

Lean marine species such as cod, hake and sole contained often lower PBDE levels, especially when originating from the Atlantic Ocean (Domingo et al., 2008, Voorspoels et al., 2007). Similar results were obtained in this study with mean levels of 0.01 - 0.15 ng g w.w.<sup>-1</sup> in cod and 0.01 - 0.15 ng g w.w.<sup>-1</sup> in hake. Mean PBDE levels found in sardine ranged from 0.03 to 0.15 ng g w.w.<sup>-1</sup>, lower to those reported by Bocio et al. (2003) (0.34 ng g w.w.<sup>-1</sup>).

Mussels and shrimp also contained low PBDE levels (generally below 1 ng g w.w.<sup>-1</sup>) compared to fish samples (Bethune and Nielsen, 2004). In the present study, PBDE levels in prawns, octopus, cuttlefish or squid were in all cases below the LOQ.

### **PBDEs dietary intake through fish and seafood obtained in different studies**

Comparing the estimated daily intake with other PBDE intakes through fish and seafood obtained in some other European countries (see Table SI.1), it can be observed that the value is slightly lower than those reported in Spain by Bocio et al. (2003) and Domingo et al. (2006), but similar to those estimated by Trudel et al. (2011) in Ireland or by Voorspoels et al. (2007) in Belgium. It should be noted that interpreting the differences between exposure assessments on PBDEs should be done with special caution due to the different methodologies used (e.g. sampling methods, food consumption data, exposure assessment model), fish species analysed, different number of congeners considered, occurrence data reported as lower-medium-upper-bound, and many other factors and/or assumptions that can influence the final exposure estimations. For example, Sioen et al. (2008) reported a PBDEs intake of 60 ng day<sup>-1</sup>, but only fatty fish

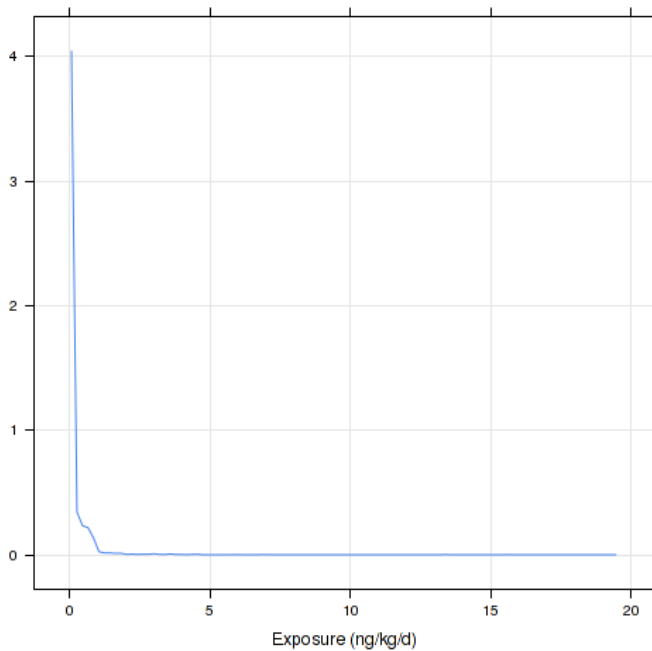
was analysed and is well known that PBDE concentrations within and between species vary a lot (Domingo et al. 2006) and that fatty fish contain high PBDE levels. On the other hand, the difference between the estimated intake obtained in this study and those reported by other Spanish researchers could be explained in part by the different fish and seafood consumption patterns, due to our regional survey reflects a fish consumption lower than those derived from national surveys.

**Table SI.1.** PBDEs dietary intake through fish and seafood obtained in different studies.

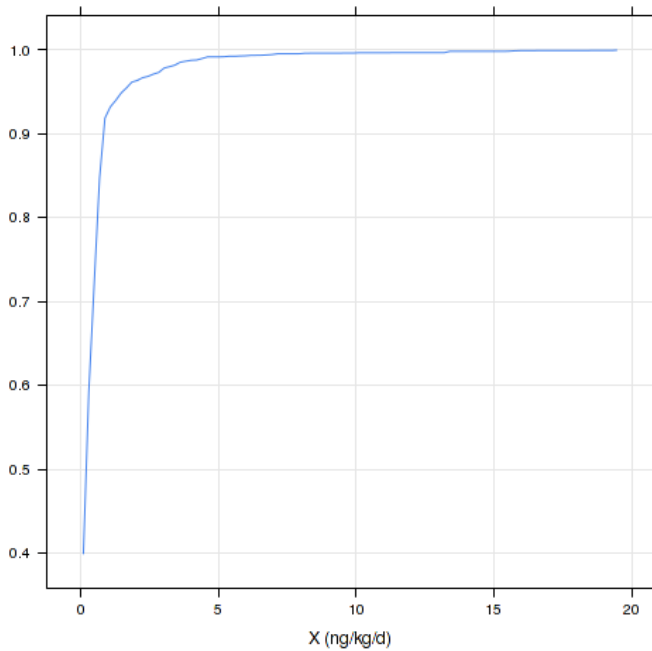
Country	Dietary intake (ng day <sup>-1</sup> )	Dietary exposure model	Reference
Belgium	13-14	Deterministic (point estimates)	Voerspoels et al. (2007)
Belgium	60	Probabilistic	Sioen et al. (2008)
Spain	20.8	Deterministic (point estimates)	Domingo et al (2007)
Finland	23	Deterministic (point estimates)	Kiviranta et al. (2004)
Ireland	11-16	Probabilistic	Trudel et al. (2011)
Spain	30.7	Deterministic (point estimates)	Bocio et al. (2003)
Spain	21	Deterministic (point estimates)	Domingo et al. (2006)
Sweden	24	Deterministic (point estimates)	Darnerud et al. (2006)
Sweden	19	Deterministic (point estimates)	Törnkvist et al. (2011)
The Netherlands	14-18	Probabilistic	Bakker et al. (2008)
Spain (2007-2012)	2-11	Probabilistic	<b>Present study</b>
Spain (2007-2012)	4-13	Deterministic (point estimates)	<b>Present study</b>

**PDF and CDF for adults and children**

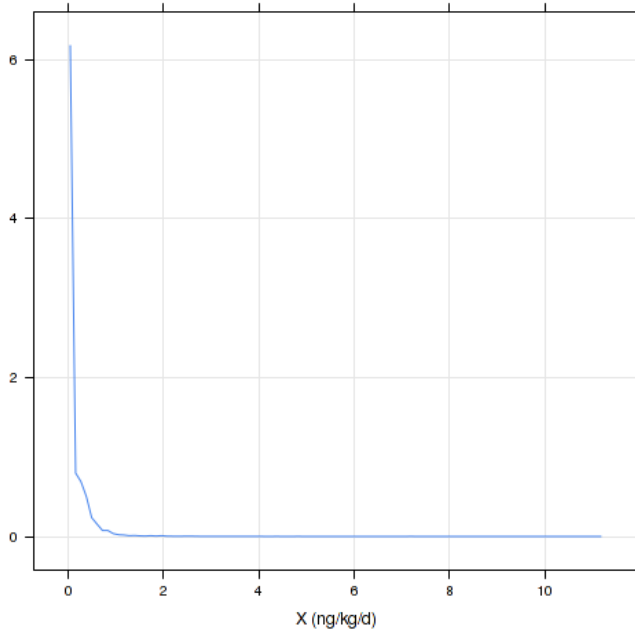
**PDF Children UB**



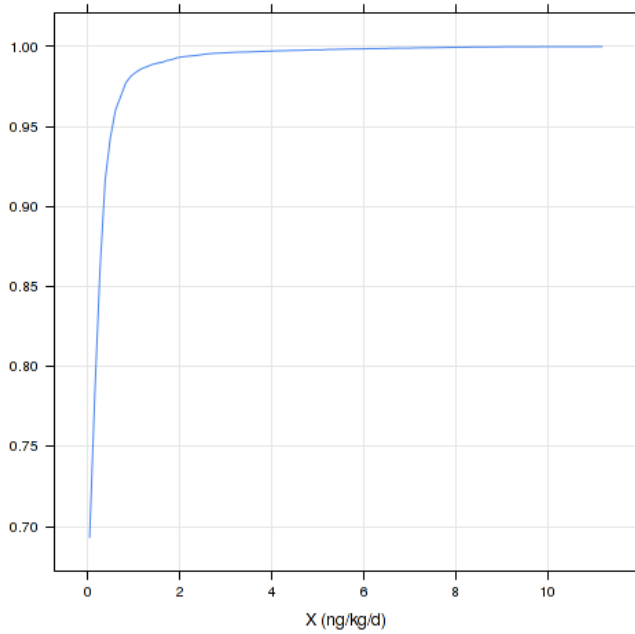
**CDF Children UB**



PDF Adults UB



CDF Adults UB



---

**References**

- Akutsu K, Obana H, Okihashi M, Kitawa M, Nakazawa H, Matsuki Y, Makino T, Oda H, Hori S., 2001. GC/MS analysis of polybrominated diphenyl ethers in fish collected from the Inland Sea of Seto, Japan. *Chemosphere* 44, 1325-1333.
- Bakker, M.I., de Winter-Sorkina, R., de Mul, A., Boon, P.E., van Donkersgoed, G., van Klaveren, J.D., Baumann, B.A., Hijman, W.C., van Leeuwen, S.P., de Boer, J., Zeilmaker, M.J., 2008. Dietary intake and risk evaluation of polybrominated diphenyl ethers in The Netherlands. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 204–216.
- Bethune C, Nielsen J., 2004. Current levels of primary polybrominated diphenyl ether (PBDE) in Norwegian seafood. *Organohalogen Compounds* 66, 3861–3866.
- Bocio A, Llobet JM, Domingo JL, Corbella J, Teixidó A, Casas C., 2003. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: human exposure through the diet. *J. of Agr. Food Chem.* 51, 3191-3195.
- Darnerud PO, Atuma S, Aune M, Bjerselius R, Glynn A, Grawé KP, Becker W., 2006. Dietary intake estimations of organohalogen contaminants (dioxins, PCB, PBDE and chlorinated pesticides, e.g. DDT) based on Swedish market basket data. *Food Chem. Toxicol.* 44 (9), 1597-1606.
- de Wit CA., 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 46, 583-624.
- Domingo, J.L., Bocio, A., Falcó, G., Llobet, J.M., 2006. Exposure to PBDEs and PCDEs associated with the consumption of edible marine species. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4394–4399.
- Domingo JL, Martí-Cid R, Castell V, Llobet JM., 2008. Human exposure to PBDEs through the diet in Catalonia, Spain: Temporal trend: A review of recent literature on dietary PBDE intake. *Toxicology* 248, 25-32.
- Easton MDL, Luszniak D, Von der Geest E., 2002. Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed. *Chemosphere* 46, 1053-1074.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2011. Scientific opinion on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in food. *EFSA J.* 9, 2156.



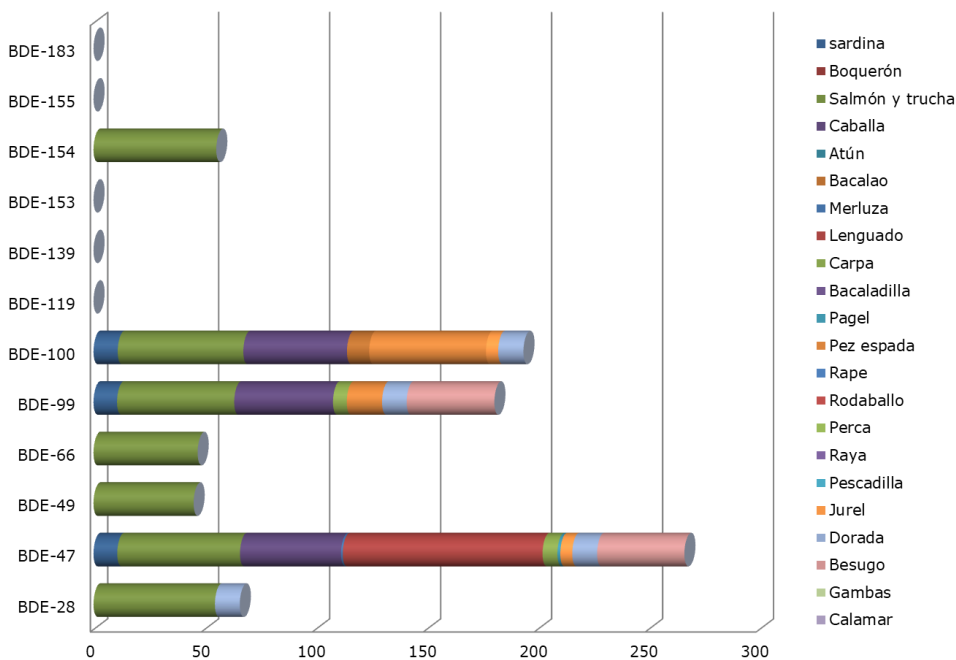
- Hites RA, Foran JA, Schwager SJ, Knuth BA, Hamilton MC, Carpenter DO., 2004. Global assessment of polybrominated diphenyl ethers in farmed and wild salmon. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4945-4949.
- Kiviranta H, Ovaskainen MAL, Vartiainen T. 2004., Market basket study on dietary intake of PCDD/Fs, PCBs, and PBDEs in Finland. *Environ. Int.* 30, 923-932.
- Law RJ, Allchin CR, de Boer J, Covaci A, Herzke D, Lepom P, Morris S, Troczynski J, de Wit C., 2006. Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. *Chemosphere* 64, 187-208.
- Leblanc JC, Volatier JL, Sirot V and Bemrah-Aouachria N, 2006. CALIPSO, Fish and seafood consumption study and biomarker of exposure to trace elements, pollutants and omega 3. The General Directorate for Foods of France's Ministry of Agriculture and Fisheries, AFSSA, the French Food Safety Agency and the French Institute for Agronomy Research INRA. Available from <<http://www.afssa.fr/Documents/PASER-Ra-Calipso-EN.pdf>>.
- Medina CM, Pitarch E, Portolés T, López FJ, Hernández F. 2008. Determination of PBDEs in human breast adipose tissues by gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. and Bioanal. Chem.* 390, 1343-1354.
- Medina CM, Pitarch E, Portolés T, López FJ, Hernández F. 2009. GC-MS/MS multi-residue method for the determination of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in human breast tissues. *J. Sep. Sci.* 32 (12) 2090-2102.
- Ohta S, Ishizuka D, Nishimura H, Nakao T, Aozasa O, Shimidzu Y, Ochiai F, Kida T, Nishi M, Miyata H. 2002. Comparison of polybrominated diphenyl ethers in fish, vegetables and metas and levels in human milk of nursering women in Japan. *Chemosphere* 46, 689-696.
- Pena-Abaurrea M, Weijs L, Ramos L, Borghesi N, Corsolini S, Neels H, Blusa R, Covaci A., 2009. Anthropogenic and naturally-produced organobrominated compounds in bluefin tuna from the Mediterranean Sea. *Chemosphere* 76, 1477-1482.
- Schechter A, Pöpke O, Tung KC, Staskal D, Birnbaum L., 2004. Polybrominated diphenyl ethers contamination of United States food. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5306-5311.

- Sioen, I., Bilau, M., Verdonck, F., Verbeke, W., Willems, J.L., De Henauw, S., Van Camp, J., 2008. Probabilistic intake assessment of polybrominated diphenyl ethers and omega-3 fatty acids through fish consumption. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, 250–257.
- Szlinder-Richert J, Barska I, Usydus Z, Grabic R., 2010. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in selected fish species from the southern Baltic Sea. *Chemosphere* 78, 695-700.
- Tittlemier, S.A., Forsyth, D., Breakell, K., Verigin, V., Ryan, J.J., Hayward, S., 2004. Polybrominated diphenyl ethers in retail fish and shellfish samples purchased from Canadian markets. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7740–7745.
- Törnkvist, A., Glynn, A., Aune, M., Darnerud, P.O., Ankarberg, E.H., 2011. PCDD/F, PCB, PBDE, HBCD and chlorinated pesticides in a Swedish market basket from 2005 – levels and dietary intake estimations. *Chemosphere* 83, 193–199.
- Trudel, D., Tlustos, C., von Goetz, N., Scheringer, M., Reichert, P., Hungerbühler, K., 2011. Exposure of the Irish population to PBDEs in food: consideration of parameter uncertainty and variability for risk assessment. *Food Addit. Contam. Part A* 28, 943–955.
- Voorspoels S, Covaci A, Neels H, Schepens P., 2007. Dietary PBDE intake: a market-basket study in Belgium. *Environ. Int.* 33, 93-97.
- Xiang CH, Luo XJ, Chen SJ. 2007. Polybrominated diphenyl ethers in biota and sediments of the Pearl River estuary, South China. *Environ. Chem. Technol.* 26, 616-623.
- Yusà V, Pardo O, Pastor A, de la Guardia M. 2006. Microwave-assisted extraction of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated naphthalenes concentrated on semipermeable membrane devices. *Anal. Chimica Acta* 565, 103-111.
- Zennegg M, Kohler M, Gerecke AC, Schmid P., 2003. Polybrominated diphenyl ethers in whitefish from Swiss lakes and farmed rainbow trout. *Chemosphere* 51, 545–553.

### 3. DISCUSIÓN

Las 25 especies de pescados y productos de la pesca, seleccionadas según los hábitos de consumo en Valencia, dieron lugar a un total de 206 muestras adquiridas en 118 establecimientos de la Comunidad Valenciana durante un período de 2007 - 2012. Los analitos estudiados son constituyentes de las principales mezclas comerciales utilizadas durante años, pentaBDE y OctaBDE, las cuales contienen en menor proporción tri-, tetra-, hexa- y hepta-BDEs. Teniendo en cuenta también, la tendencia de los congéneres más sustituidos a sufrir debromación dando lugar a los menos sustituidos, es lógico pensar que los resultados de los análisis, mostraran una mayor prevalencia de los tetra- y penta-BDEs (BDE-47, BDE-100 y BDE-99, en orden decreciente), tal y como se puede observar en la **Tabla 1** del *Artículo Científico 4* y en la **Figura 20** de este apartado.

**Niveles medios de PBDEs por especie**



**Figura 20.** Niveles medios de cada analito obtenidos para cada una de las especies.

Sin embargo, las máximas concentraciones medias obtenidas en el total de las especies estudiadas, fueron para el BDE-47 (90.0 pg/g peso fresco), BDE-100 (56.6 pg/g peso fresco) y BDE-154 (55.3 pg/g peso fresco), todos ellos en salmón y trucha.

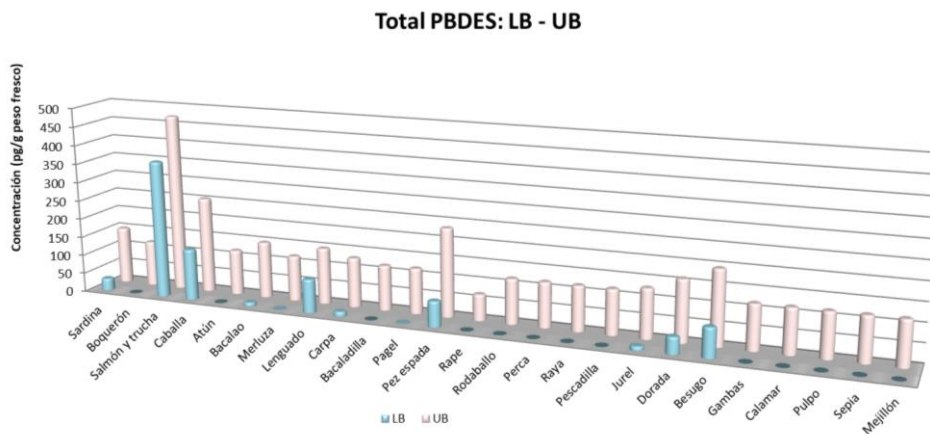
Se compararon los resultados del presente estudio con los recogidos por la EFSA en su Opinión Científica sobre PBDEs en los alimentos (EFSA 2011), en la que los niveles más altos en la categoría de "pescados y productos de la pesca", fueron, del mismo modo que en nuestro estudio, para el BDE-47 (1.30 – 1.32 ng/g peso fresco) seguido del BDE-100 (0.33 – 0.36 ng/g peso fresco), aunque a concentraciones mucho más altas, debido probablemente a que los datos fueron obtenidos de otros 11 países europeos. Del mismo modo, en otros estudios, se obtuvo también que los PBDEs encontrados más frecuentemente fueron el BDE-47 y el BDE-100 en pescados de ríos y lagos de Illinois (Widelka et al. 2016) y también en pescados capturados en el mar Adriático en Eslovenia (Novak et al. 2017), cuya concentración del BDE-47 fue de 0.09 – 0.54 ng/g peso fresco. En pescado muestreado de supermercados de Tarragona se encontraron niveles de BDE-47 de 0.3 a 0.7 ng/g peso fresco (Trabalón et al. 2017), obteniendo en nuestro estudio, niveles totales de BDE-47 de 0.35 ng/g peso fresco.

Además de esto, las concentraciones de PBDEs totales se obtuvieron de dos modos distintos, de acuerdo con las recomendaciones establecidas por la organización mundial de la salud (WHO) seguidas en evaluaciones del riesgo en alimentos (World Health Organization & International Programme on Chemical Safety 1999):

- Considerando que los resultados de cada BDE no cuantificable es menor al límite de cuantificación, y por lo tanto no contribuye al sumatorio de los congéneres, denominado límite inferior (LB), conforme se han interpretado los resultados en los párrafos anteriores.
- Considerando que los resultados de cada BDE no cuantificable, es igual al límite de cuantificación, y por lo tanto, contribuye con este valor al sumatorio de todos los congéneres, se le denomina límite superior (UB).

De este modo se asumieron dos escenarios diferentes, en el límite inferior y en el límite superior.

En la **Figura 21**, se comparan las concentraciones medias de los PBDEs totales obtenidos en cada una de las especies estudiadas, en ambos escenarios.



**Figura 21.** Niveles medios de PBDEs totales en cada una de las especies de pescado y productos de la pesca estudiados, obtenidos como límite inferior (LB) y como límite superior (UB).

Tal y como se puede apreciar en esta figura, las especies con una mayor prevalencia de PBDEs fueron, en primer lugar, salmón y trucha (0.37 – 0.47 ng/g peso fresco), seguida de la caballa (0.14 – 0.26 ng/g peso fresco), pez espada (0.18 – 0.24 ng/g peso fresco), lenguado (0.09 – 0.15 ng/g peso fresco), besugo (0.08 – 0.20 ng/g peso fresco) y dorada (0.04 – 0.16 ng/g peso fresco), y ya, en menor medida, la sardina (0.03 – 0.15 ng/g peso fresco), la carpa (0.03 – 0.13 ng/g peso fresco) y el jurel (0.01 – 0.13 ng/g peso fresco). Los niveles de PBDEs obtenidos en las diferentes especies de pescados y productos de la pesca dependen del contenido lipídico de cada especie (EFSA 2011), por ejemplo, como se puede apreciar en la **Figura 21**, el salmón fue la especie con mayor contribución de PBDEs debido a su alto contenido lipídico (11 - 12%). Los resultados fueron similares a los de otros estudios, como por ejemplo, los obtenidos en pescado de Tarragona, en el que el salmón fue también el que tenía una mayor contribución total de PBDEs (1.3 ng/g peso fresco), aunque a mayor concentración, quizá por deberse a un período muy posterior al del presente estudio (Trabalón et al. 2017). La concentración de PBDEs total en salmón, en el presente estudio, fue inferior a la obtenida en salmón del Mar Báltico (2.5 ng/g peso fresco)

(Szlinder-Richert et al. 2010) y superior al capturado en Alaska en el año 2000, en el que la concentración del BDE-47 era de 0.03 – 0.3 ng/g peso fresco (Easton et al. 2002). En pescado capturado en el Reino Unido, se obtuvieron niveles medios del  $\Sigma$ PBDEs listados en la recomendación de la EU 2014/118/EU, para especies de caballa (1.1 ng/g peso fresco), de rodaballo (0.3 ng/g peso fresco) o de sardina (0.5 ng/g peso fresco) (Zhihua et al. 2018), todas ellas con concentraciones superiores a las que se obtuvieron en el presente estudio.

Mediante los datos de consumo obtenidos de encuestas-cuestionarios basadas en la dieta a 1478 personas (entre adultos y niños), y llevadas a cabo durante 2010 en la misma zona donde se recogieron las muestras, se calcularon las ingestas diarias estimadas teniendo en cuenta dos escenarios distintos, LB y UB, para adultos (16 – 95 años y 71.2 kg de peso corporal) y niños (6 – 15 años y 43.5 kg de peso corporal). Para ello, se multiplicó [Cantidad de pescado] x [Concentración de BDE] en cada uno de los casos y escenarios posibles.

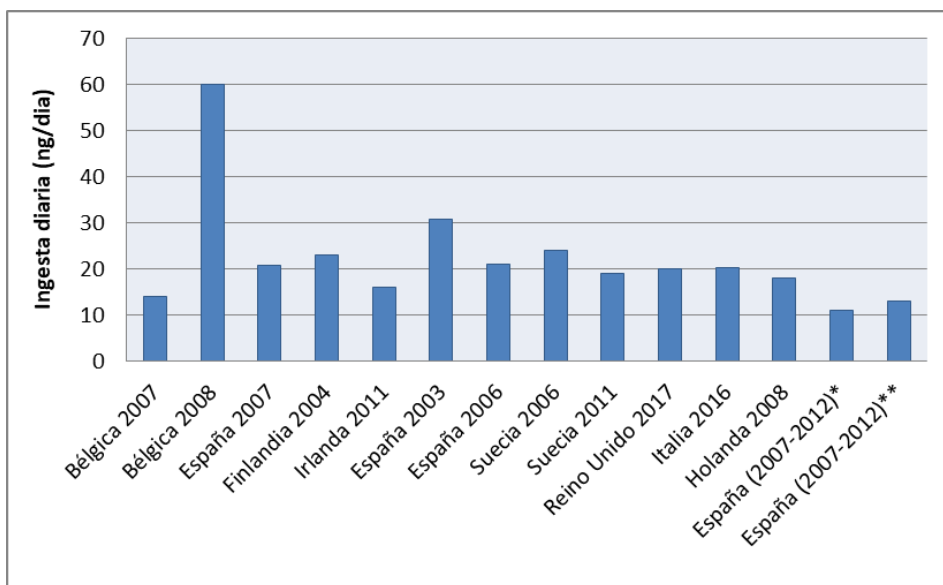
Se aplicaron dos metodologías diferentes para la evaluación de la exposición, la determinística y la probabilística. En la primera de ellas se tuvo en cuenta el consumo medio y percentil 95 de pescado, en la segunda, se obtuvo una distribución global de la exposición a partir de los datos de consumo medio y percentiles 90, 95 y 99. En las **Tablas 2 y 3** del *Artículo Científico 4* se detallan las ingestas diarias estimadas mediante las dos metodologías, respectivamente, y teniendo en cuenta todas las consideraciones mencionadas en cada una de ellas, además de la incertidumbre para el método probabilístico, expresada como percentil de exposición a un 95% del intervalo de confianza.

Tal y como puede apreciarse en las tablas mencionadas del artículo, los resultados obtenidos fueron similares aplicando ambas metodologías, aunque en algunos casos fueron ligeramente menores al utilizar el modelo probabilístico. La ventaja que presenta el uso de este modelo es que permite tener en cuenta una distribución global de la exposición. Por ello, y visto que no existían diferencias significativas entre ambos modelos, se usaron los datos resultantes de aplicar el modelo probabilístico para la caracterización del riesgo y para las futuras consideraciones o discusiones.

Los PBDEs con una mayor contribución a la exposición media a través de la dieta fueron, principalmente, el BDE-47, con ingestas diarias estimadas de 0.039 ng/kg peso corporal/día (LB, adultos) a 0.064 ng/kg peso corporal/día (UB, adultos), es decir, del 33 – 57% de la exposición a  $\Sigma$ PBDEs, lo que era acorde a los datos informados por la EFSA en 2011 (EFSA 2011), ya que el BDE-47 era el PBDE que más contribuía a dicha exposición, del 32% a 78%; le seguían el BDE-49 (0.007 – 0.022 ng/kg peso corporal/día), BDE-100 (0.010 – 0.020 ng/kg peso corporal/día) y BDE-99 (0.008 – 0.017 ng/kg peso corporal/día).

La ingesta diaria estimada de la media de la suma de PBDEs (UB) para adultos y niños fue de 0.137 ng/kg peso corporal/día y 0.180 ng/kg peso corporal/día, respectivamente. La diferencia entre la ingesta diaria estimada de niños y adultos se explica por las diferencias en el peso corporal y por la diferencia de los patrones de consumo de pescado y productos de la pesca para grupos diferentes de edad. En la **Tabla SI.1** del “*Supplementary Material*” del *Artículo Científico 4*, se indica una comparación entre las ingestas diarias estimadas en el presente estudio y las de otros estudios, la cual se expresa y actualiza en la **Figura 22** en forma de gráfico, y de la que podemos decir que nuestros valores obtenidos fueron ligeramente inferiores a los de otros estudios realizados en España durante 2003, 2006 y 2007 (Bocio et al. 2003; Domingo et al. 2006; Domingo et al. 2008), e inferiores también a las ingestas diarias estimadas en Italia en 2016 o Reino Unido en 2017 (Martellini et al. 2016; Tao et al. 2017), pero similares a los estimados en Irlanda en 2011 y en Bélgica durante 2007 (Trudel et al. 2011; Voorspoels et al. 2007). Hay que tener en cuenta, que existen diversos factores que pueden afectar a la evaluación de la exposición a PBDEs, entre ellos, el número de congéneres de PBDEs analizados en cada estudio que contribuyen al  $\Sigma$ PBDEs (como la presencia o ausencia del BDE-209 en dicho sumatorio), las diferentes metodologías utilizadas (métodos de muestreo, datos de consumo de los alimentos o modelos para la evaluación de la exposición), las especies de pescado analizadas, los datos de prevalencia en términos de límite inferior, intermedio o superior, entre muchos otros factores o consideraciones. Por ejemplo, la máxima ingesta diaria observada en la **Figura 22**, corresponde a la estimada en Bélgica en 2008 (Sioen et al. 2008) con un valor de 60 ng/día, debido a que los datos se obtuvieron de

analizar únicamente pescados grasos, sabiendo que los PBDEs son lipofílicos y que por tanto, se encuentran las concentraciones más altas de los mismos en los pescados con alto contenido graso.



**Figura 22.** Comparación entre las ingestas diarias estimadas en el presente estudio y las obtenidas de otros estudios en diferentes países europeos.

\*Valor máximo obtenido mediante el modelo probabilístico (presente estudio).

\*\*Valor máximo obtenido mediante el modelo determinístico (presente estudio).

Por otro lado, se debe resaltar, que en el presente estudio, no se determina el BDE-209, a pesar de que junto al BDE-47, son los que más contribuyen a la exposición de PBDEs, tal y como indica la EFSA (EFSA 2011), sin embargo, el *CONTAM Panel* concluía que la exposición de los alimentos debida al BDE-209 en la Unión Europea no planteaba preocupación para la salud.

Por otra parte, los pescados y productos de la pesca que más contribuyen en la exposición a los PBDEs a través de la dieta fueron determinados mediante el cálculo de la contribución media de cada especie a la exposición global. El salmón, caballa y pez espada fueron los principales contribuyentes, tal y como se puede apreciar, a priori, en la **Figura 21** por



sus niveles de contaminación, y que se traduce en un 20% aproximado de cada uno del total de la dosis de PBDEs. Esta contribución de cada una de las especies, evidentemente, va a depender del nivel de contaminación o concentración media de PBDEs y de los patrones de consumo. Por ejemplo, aunque algunas especies de pescado como bacalao o merluza contienen niveles bajos de PBDEs (Voorspoels et al. 2007; Domingo et al. 2008), su consumo en la Comunidad Valenciana es elevado, lo que supone una contribución a su exposición global a través de la dieta, del 15% y 11%, respectivamente. Finalmente, la sardina y dorada suponen un 10% y 4%, respectivamente, de la ingesta total de PBDEs a través de pescado y productos de la pesca.

Ahora bien, según la información procedente de experimentos sobre toxicología en animales, el Panel sobre contaminantes en la cadena alimentaria, obtuvo, como punto de partida para la caracterización del riesgo las dosis de referencia, únicamente, para el BDE-47, BDE-99 y BDE-153, y sus correspondientes límites mínimos de confianza para la dosis de referencia ( $BMDL_{10}$ , que se corresponde con una confianza del 95% a una respuesta del valor de referencia del 10%), 172  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal/día, 4.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal/día y 9.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  peso corporal/día, respectivamente (EFSA 2011). A partir de los  $BMDL_{10}$  y de la ingesta de PBDEs estimada a través de la dieta para una población general o subgrupos específicos de población, fue posible establecer los márgenes de exposición para estos tres analitos. Se obtuvieron los MOE en dos escenarios diferentes (LB y UB), en niños y adultos, y como consumidores medios y elevados de pescado y productos de la pesca (ver **Tabla 4** del *Artículo Científico 4*). En una caracterización del riesgo tradicional, se aplica un factor de evaluación por defecto de 2.5 (World Health Organization & International Programme on Chemical Safety 1999), el cual se considera suficiente para cubrir las diferencias entre especies, como por ejemplo, diferencias toxico-dinámicas entre animales experimentales y humanos, lo que implica que, en el caso de los PBDEs, en principio, cualquier valor de MOE superior a 2.5, indica un riesgo improbable para la salud. Por tanto, cuanto mayor sea un valor MOE, menor será el dicho riesgo sobre la salud (EFSA 2011). En ninguno de los supuestos considerados se obtuvieron MOEs inferiores a 2.5. Por lo que, a la

vista de estos resultados, no existe riesgo para la salud con respecto a la exposición actual a través de la dieta en la Comunidad Valenciana.

Por otra parte, a partir de los resultados generados por el modelo probabilístico, función de densidad de probabilidad (PDF) y función de densidad acumulada (CDF) para niños y adultos en un escenario pesimista (UB) (ver *Supplementary Material*), se obtuvo también el porcentaje de población que podría estar en riesgo. Para ello, se seleccionó un valor de MOE crítico, 2.5, y se calculó la ingesta crítica de PBDEs a través de la dieta, por encima de la cual podría ser considerada un riesgo para la salud. Dicha ingesta crítica fue comparada con la estimada mediante la función de probabilidad obtenida de la evaluación probabilística (en un escenario pesimista o UB), lo que se realizó mediante la herramienta *Limit Analysis* disponible en el software Creme Food®. Los resultados mostraron que solo un 0.05% de la población adulta (2140 consumidores de un total de población de 5129622 en la Comunidad Valenciana) y un 0.1% de la población infantil (498 consumidores de un total de 497792 niños en la Comunidad Valenciana) podrían estar en riesgo derivado de la ingesta del BDE-99 a través de pescado y productos de la pesca.

Por otra parte, para una correcta interpretación de los resultados, fue necesario considerar ciertas incertidumbres que podían afectar a la evaluación de la exposición a través de la dieta. Por ejemplo, incertidumbres debidas al muestreo de los datos introducidos (concentraciones y consumos), las cuales fueron estimadas usando métodos *bootstrap*. Esta incertidumbre fue expresada por percentil de exposición como un 95% de confianza. O las encuestas de consumo alimentario, como las usadas en este estudio (*24-h recall*), podrían tender a sufrir errores aleatorios y no sistemáticos. Otros parámetros podrían afectar a la incertidumbre de la exposición calculada. Factores de variabilidad, que normalmente dan lugar a niveles de exposición más altos, no fueron utilizados en este estudio. Por otro lado, el elevado porcentaje de muestras con niveles menores del límite de comunicación (LOR), considerado igual al LOQ, podían tener incluidas incertidumbres para la estimación global. En el modelo pesimista, teniendo en cuenta que cualquier valor inferior al LOQ se consideraba igual al valor del LOQ, es esperable una sobre-estimación de la exposición, mientras que con el modelo optimista, en el que los valores

inferiores al LOQ fueron considerados igual a cero, se podía esperar una infra-estimación de la exposición (EFSA 2012). En el presente estudio no se utilizaron factores de procesado de los alimentos, de haberlos utilizado, la exposición estimada podría haber sido igual o incluso menor de la obtenida, ya que, por una parte la presencia de PBDEs no va asociada a los mecanismos de procesado de los alimentos, y por otra parte son sustancias lipofílicas químicamente estables, por lo que una menor concentración de estas sustancias en los alimentos cocinados es probablemente causa de la pérdida de grasa en lugar de por degradación de los PBDEs.

Para concluir, como ya se ha indicado al inicio del presente capítulo, la principal exposición humana a PBDEs es a través del consumo de pescados y productos de la pesca. Sin embargo, se debe resaltar que para calcular o estimar una ingesta total diaria de PBDEs se debería considerar otras rutas de exposición como polvo, aire o exposición a través de otros productos de la dieta, como productos cárnicos, huevos, lácteos, aceites, etc. Se debería tener en cuenta también, para futuros trabajos, el análisis del BDE-209, ya que la EFSA lo describe como un gran contribuyente en la exposición al total de PBDEs.

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

- Asociación Española de Normalización (UNE) (2018). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*. ISO/IEC 17025:2017.
- Bocio, A., Llobet, J.M., Domingo, J.L., Corbella, J., Teixidó, A. & Casas, C. (2003). *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs: Human exposure through the diet*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3191–3195. doi:10.1021/jf0340916.
- Domingo, J.L., Bocio, A., Martí-Cid, R. & Llobet, J.M. (2006). *Benefits and risks of fish consumption*. *Toxicology*, 230, 227–233. doi:10.1016/j.tox.2006.11.059.
- Domingo, J.L., Martí-Cid, R., Castell, V. & Llobet, J.M. (2008). *Human exposure to PBDEs through the diet in Catalonia, Spain: Temporal trend. A review of recent literature on dietary PBDE intake*. *Toxicology*, 248, 25–32. doi:10.1016/j.tox.2008.03.006.
- Easton, M.D.L., Lusznjak, D. & Von der Geest, E. (2002). *Preliminary examination of contaminant loadings in farmed salmon, wild salmon and commercial salmon feed*. *Chemosphere*, 46, 1053–1074.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2011). *Scientific Opinion on Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Food*. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *The EFSA Journal* 9 (5) 2156. doi:10.2903/j.efsa.2011.2156
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012). *Guidance on the use of probabilistic methodology for modelling dietary exposure to pesticide residues: Scientific Opinion of the EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR)*. *The EFSA Journal*, 10 (10) 2839. doi:10.2903/j.efsa.2012.2839.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) & World Health Organization (WHO) (2006). *Food Safety Risk Analysis. A Guide for National Food Safety Authorities*. FAO Food and Nutrition Paper 87. <http://www.fao.org/docrep/012/a0822e/a0822e.pdf>.

- Fromme, H., Becher, G., Hilger, B. & Völkel, W. (2016). *Brominated flame retardants - Exposure and risk assessment for the general population*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 219, 1–23. doi:10.1016/j.ijheh.2015.08.004.
- Martellini, T., Diletti, G., Scortichini, G., Lolini, M., Lanciotti, E., Katsoyiannis, A. & Cincinelli, A. (2016). *Occurrence of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs in Italy and implications for human exposure*. Food and Chemical Toxicology, 89, 32–38. doi:10.1016/j.fct.2015.12.026.
- Novak, P., Zuliani, T., Milačič, R. & Sčančar, J. (2017). *Development of an analytical method for the determination of polybrominated diphenyl ethers in mussels and fish by gas chromatography—inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1524, 179–187. doi:10.1016/j.chroma.2017.09.059.
- Perelló, G., Díaz-ferrero, J., Llobet, J.M., Castell, V., Vicente, E., Nadal, M. & Domingo, J.L. (2015). *Human exposure to PCDD/Fs and PCBs through consumption of fish and seafood in Catalonia (Spain): Temporal trend*. Food and Chemical Toxicology, 81, 28–33. doi:10.1016/j.fct.2015.04.010.
- Sioen, I., Bilau, M., Verdonck, F., Verbeke, W., Willems, J.L., De Henauw, S., & Van Camp, J. (2008). *Probabilistic intake assessment of polybrominated diphenyl ethers and omega-3 fatty acids through fish consumption*. Molecular Nutrition & Food Research, 52, 250–257.
- Stockholm Convention (2009) SC-4 / 14. *Listing of hexabromodiphenyl ether and heptabromodiphenyl ether*.
- Stockholm Convention (2009) SC-4 / 17. *Listing of perfluorooctane sulfonic acid, its salts and perfluorooctane sulfonyl fluoride*.
- Szlinder-Richert, J., Barska, I., Usydus, Z. & Grabic, R. (2010). *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in selected fish species from the southern Baltic Sea*. Chemosphere, 78, 695–700.
- Tao, F., Abdallah, M.A.-E., Ashworth, D.C., Douglas, P., Toledano, M.B. & Harrad, S. (2017). *Emerging and legacy flame retardants in UK human milk and food suggest slow response to restrictions on use of PBDEs and HBCDD*. Environment International, 105, 95–104. doi:10.1016/j.envint.2017.05.010.

- Trabalón, L., Vilavert, L., Domingo, J.L., Pocurull, E., Borrull, F. & Nadal, M. (2017). *Human exposure to brominated flame retardants through the consumption of fish and shellfish in Tarragona County (Catalonia, Spain)*. *Food and Chemical Toxicology*, 104, 48–56. doi:10.1016/j.fct.2016.11.022.
- Trudel, D., Tlustos, C., von Goetz, N., Scheringer, M., Reichert, P. & Hungerbuhler, K. (2011). *Exposure of the Irish population to PBDEs in food: Consideration of parameter uncertainty and variability for risk assessment*. *Food Additive Contaminants Part A*, 28, 943–955.
- Voorspoels, S., Covaci, A., Neels, H. & Schepens, P. (2007). *Dietary PBDE intake: A market-basket study in Belgium*. *Environment International*, 33, 93–97. doi:10.1016/j.envint.2006.08.003.
- Widelka, M., Lydy, M.J., Wu, Y. & Chen, D. (2016). *Statewide surveillance of halogenated flame retardants in fish in Illinois, USA*. *Environmental Pollution*, 214, 627-634. doi:10.1016/j.envpol.2016.04.063.
- World Health Organization & International Programme on Chemical Safety (1999). *Principles for the assessment of risks to human health from exposure to chemicals*. World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/42156>
- Zhijia, L., Panton, S., Marshall, L., Fernandes, A., Rose, M., Smith, F. & Holmes, M. (2018). *Spatial analysis of polybrominated diphenylethers (PBDEs) and polybrominated biphenyls (PBBs) in fish collected from UK and proximate marine waters*. *Chemosphere*, 195, 727-734. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.11.114.

**CAPÍTULO 5**  
**CONCLUSIONES**







## CONCLUSIONES

En base a los estudios que componen la presente **Tesis Doctoral**, cabe resaltar, las siguientes **conclusiones generales**:

1. Los acoplamientos instrumentales de gran potencia como son la cromatografía con la espectrometría de masas aportan una mayor sensibilidad y selectividad a los métodos desarrollados, y por ende, una mayor fiabilidad de los resultados en la determinación de contaminantes emergentes, como son las PFAS, PBDEs y OPs en muestras alimentarias (pescados), ambientales (aire) y biológicas (leche materna).
2. Tanto la espectrometría de masas en tándem con analizador de triple cuadrupolo (QqQ) o trampa iónica como la espectrometría de masas de alta resolución con orbitrap constituyen dos herramientas analíticas poderosas para la determinación de contaminantes emergentes tanto en muestras alimentarias, ambientales como biológicas. El uso del QqQ en las determinaciones de PFAS y PBDEs en la materia particulada del aire y de la trampa iónica en la determinación de PBDEs en pescados aporta gran selectividad y sensibilidad a los métodos desarrollados para aplicaciones cuantitativas, mientras que el uso del orbitrap en la determinación de PFAS y OPs en leche materna ha demostrado ser un método selectivo y confirmatorio para aplicaciones cuantitativas, además de mantener abierta la posibilidad de realizar análisis retrospectivo tanto para el cribado de sustancias sospechosas como para el análisis de sustancias desconocidas.
3. La optimización de algunas etapas complejas en las distintas metodologías desarrolladas mediante diseño experimental facilita dicha optimización, especialmente cuando se trata de etapas con parámetros dependientes, aportando robustez, exactitud y reproducibilidad al método y maximizando la eficiencia del proceso global.
4. La importancia de realizar estudios de efecto matriz en cualquier tipo de muestras, como por ejemplo en la materia particulada del aire, pescados o leche materna, ya que aporta la información necesaria para la aplicación de etapas de purificación más o menos

exhaustivas, o la necesidad de utilizar calibración interna y/o en matriz.

5. Mediante la aplicación de las diferentes normas y guías de validación se ha demostrado la validez de cada uno de los métodos en cuanto a exactitud, reproducibilidad, sensibilidad y selectividad.
6. La importancia del desarrollo de metodologías analíticas fiables para llevar a cabo estudios de evaluación de la exposición, y un consecuente análisis del riesgo, con el fin de dar soporte a los sistemas de vigilancia y control en salud pública.

Dentro de cada uno de los trabajos presentados en esta **Tesis Doctoral** se pueden extraer las siguientes **conclusiones específicas**:

1. Las técnicas de extracción MAE y de determinación mediante HPLC-(ESI)-MS/MS son aplicables para el análisis de las PFAS iónicas en la materia particulada del aire (PM<sub>2.5</sub>), lo que permite desarrollar una metodología sensible y confirmatoria, capaz de aportar resultados fiables en estudios o programas de *monitoring*.
2. A la vista de los resultados obtenidos del estudio del efecto matriz en la determinación de PFAS iónicas en la materia particulada del aire, se concluye que la combinación de una etapa de purificación sencilla como es una ultra-centrifugación para la eliminación de interferencias del extracto final junto con el uso de patrones internos marcados isotópicamente para la compensación del efecto matriz ha resultado ser adecuada para subsanar y corregir dicho efecto.
3. Los resultados obtenidos en las 41 muestras analizadas con el fin de determinar la presencia de PFAS iónicas en las PM<sub>2.5</sub> y de demostrar la aplicabilidad del método desarrollado mostraron la presencia de ocho PFAS estudiadas en al menos una muestra. Sin embargo, debería considerarse para futuros estudios de *monitoring* la posibilidad de obtener mayores volúmenes de muestreo (1500 – 2000 m<sup>3</sup>), y reducir así los límites de cuantificación a niveles más bajos (< 1.0 pg/m<sup>3</sup>).
4. El acoplamiento de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas en tándem haciendo uso del PTV para la inyección de grandes volúmenes ha demostrado ser una de las técnicas más poderosas para la determinación de PBDEs en cualquier tipo de

- matriz, evidenciando su potencial en muestras de materia particulada del aire PM2.5 y en pescados y productos de la pesca.
5. La selección y optimización de dos y tres transiciones para las determinaciones de PFAS y PBDEs en la materia particulada del aire (PM2.5), además del cumplimiento de los criterios de identificación y confirmación establecidos en la decisión de la comisión europea 2002/657/EC aportan de una gran selectividad al método desarrollado.
  6. El uso de una técnica de extracción como es la extracción asistida con microondas ha proporcionado buenos resultados tanto para la determinación de las PFAS como de los PBDEs en la fase particulada del aire; esta técnica automatiza la extracción y minimiza el volumen de disolventes de extracción, resultando ser una técnica eficaz para la determinación de contaminantes emergentes.
  7. La metodología desarrollada para la determinación de PBDEs en la fase particulada del aire puede ser utilizada en estudios o programas de *monitoring* de muestras medioambientales haciendo uso de los muestreadores ya instalados en diferentes países para controlar la materia particulada fina. Sin embargo, el método desarrollado no incluye el análisis del BDE-209, siendo de gran relevancia tanto en el campo medioambiental como en el de seguridad alimentaria. La dificultad en la determinación del BDE-209 se debe a la rápida degradación térmica que sufre este compuesto. Por tanto, se requiere del uso de una columna cromatográfica corta (de 10 a 15 m) para que la separación cromatográfica se dé con mayor rapidez. Este cambio ha sido realizado con posterioridad en esta metodología para incluir el BDE-209 en la determinación de PBDEs, modificando únicamente la columna cromatográfica y el gradiente de temperaturas para llevar a cabo una separación de los analitos adecuada.
  8. La cromatografía líquida de ultra-alta presión acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución con analizador orbitrap, además de ser, una técnica avanzada y novedosa, ha resultado tener un gran potencial para la determinación de diferentes familias de contaminantes orgánicos emergentes, como son las PFAS y los OPs. Esta técnica aporta numerosas ventajas a tener en cuenta, entre

- ellas la opción de realizar tanto análisis dirigidos como no dirigidos, lo que puede ser de gran relevancia en estudios de biomonitorización en leche materna.
9. La metodología sobre la determinación de PFAS y OPs en leche materna ha sido desarrollada y validada e incluye la extracción mediante QuEChERS, la cual ha sido de gran utilidad para llevar a cabo un análisis fácil y rápido de estas dos familias de sustancias con un amplio abanico de polaridades, y con un bajo consumo de disolvente.
  10. La optimización multivariante utilizada mediante diseños experimentales en cada una de las metodologías desarrolladas ha facilitado en gran medida la optimización de las etapas más complejas, como la extracción por MAE en las determinaciones de PFAS y de PBDEs en las PM2.5, la inyección de grandes volúmenes mediante PTV en un GC-MS/MS en ésta última determinación y la ionización por H-ESI para la determinación de PFAS y OPs en leche materna mediante UHPLC-HRMS. Se ha hecho uso del diseño Plackett-Burman para conocer los parámetros más relevantes en la ionización de las PFAS y OPs en leche materna con el fin de identificar aquellos que afectan en mayor o menor medida a la respuesta de cada uno de los analitos. El diseño experimental utilizado en cada una de las etapas optimizadas, una vez seleccionados los 3 o 4 parámetros más relevantes, es el diseño de composición central (CCD) del cual se han extraído gráficos de superficie de respuesta en función de dos factores, y los valores de deseabilidad individual y global que facilitan la identificación de los valores óptimos.
  11. La metodología utilizada para la determinación de PBDEs en pescados y productos de la pesca incluye técnicas actuales como la extracción acelerada con disolvente, con la que se consigue una extracción eficaz y reproducible debido a la automatización de esta etapa, además de ser una técnica rápida y con un bajo consumo de disolvente, la extracción en fase sólida y la GC-MS/MS. La combinación de estas técnicas ofrece de sensibilidad, selectividad y reproducibilidad a la metodología desarrollada.

12. Del estudio de la evaluación del riesgo debido a la exposición humana a los PBDEs a través del consumo de pescados y productos de la pesca realizado, se estiman las ingestas diarias mediante un modelo determinístico y uno probabilístico. Mediante el método probabilístico se obtiene una distribución de la exposición, lo que configura un modelo más realista que tiene en cuenta la variabilidad del consumo de alimentos y de la contaminación de los pescados.
13. A partir de estas ingestas diarias estimadas se concluye que, según el modelo probabilístico y en un escenario pesimista (UB), solo un 0.05% de la población adulta y un 0.1% de los niños podrían estar en riesgo derivado del BDE-99 a través de la ingesta de pescado. Del mismo modo, mediante el cálculo de los márgenes de exposición para el BDE-47, BDE-99 y BDE-153 se concluye que, tanto para grandes como medios consumidores de pescados y para niños y adultos, no hay evidencias que indiquen una preocupación sobre la salud con respecto a la exposición actual a través de la dieta en la Comunidad Valenciana.
14. La principal exposición humana a PBDEs es a través del consumo de pescados y productos de la pesca. Sin embargo, para calcular o estimar una ingesta total diaria de PBDEs se debería considerar otras rutas de exposición como polvo, aire o exposición a través de otros productos de la dieta, como productos cárnicos, huevos, lácteos, aceites, etc.





