

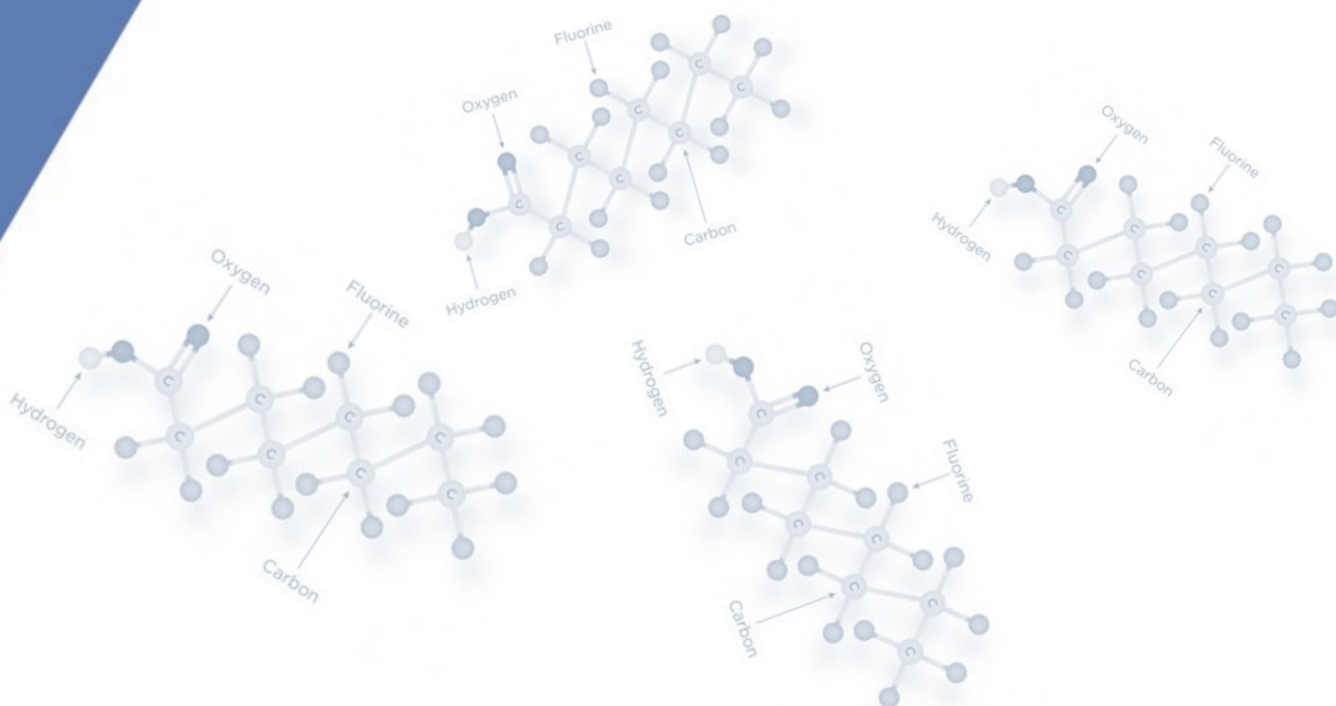


Plan de Monitoreo Global de Contaminantes Orgánicos Persistentes

Protocolo 1

Análisis de ácido sulfónico de perfluorooctano (PFOS) en agua y perfluorooctanosulfonamida (FOSA) en leche materna, sangre humana y aire, y análisis de algunas sulfonamidas de perfluorooctano (FOSAS) y etanoles de sulfonamida de perfluorooctano (FOSES) en aire

Abril 2015



Procedimiento para el análisis de contaminantes orgánicos persistentes en matrices ambientales y humanas para la aplicación del Plan de Monitoreo Global en el marco del Convenio de Estocolmo

Protocolo 1:

Análisis de ácido sulfónico de perfluorooctano (PFOS) en agua y perfluorooctanosulfonamida (FOSA) en leche materna, sangre humana y aire, y análisis de algunas sulfonamidas de perfluorooctano (FOSAS) y etanoles de sulfonamida de perfluorooctano (FOSES) en aire

Subdivisión de productos químicos
Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA)
Economía División

Ginebra

Abril de 2015

Este documento ha sido preparado por el:

Instituto de Estudios Ambientales
Universidad VU
De Boelelaan 1087
NL-1081HV Ámsterdam
Países Bajos

Para:

Subdivisión de productos químicos
Economía División
Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

En el marco del proyecto “Establecimiento de herramientas y métodos para incluir los nueve nuevos COP en el Plan de Monitoreo Global”; Proyecto ID GFL 2328-2760-4B97 con la asistencia financiera del Fondo Mundial para el Medio Ambiente.

Protocolo 1:

Análisis de ácido sulfónico de perfluorooctano (PFOS) en agua y perfluorooctano sulfonamida (FOSA) en leche materna, sangre humana y aire, y análisis de algunas sulfonamidas de perfluorooctano (FOSAS) y etanoles de sulfonamida de perfluorooctano (FOSES) en aire

1 ALCANCE

El Plan de Monitoreo Global del Convenio de Estocolmo establece un marco para el análisis de los contaminantes orgánicos persistentes (COP); en él se enumeran los congéneres que se recomienda analizar en las matrices principales (ver el capítulo 2 de la “Orientación para el Plan de Monitoreo Global para contaminantes orgánicos persistentes”, PNUMA 2013). Es preciso contar con un protocolo que garantice que estos compuestos se analicen siempre correctamente y de la misma manera en los diferentes laboratorios. Con el fin de asistir a los laboratorios en su análisis de los COP, la Subdivisión de productos químicos de la División de Tecnología, Industria y Economía (DTIE) del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente está desarrollando procedimientos genéricos para el análisis de los COP iniciales y los nuevos.

Este procedimiento cubre ácido sulfónico de perfluorooctano (PFOS) y sulfonamida de perfluorooctano (FOSA) en agua, leche materna, suero humano y aire, y el análisis de metilsulfonamida de perfluorooctano (MeFOSA), etilsulfonamida de perfluorooctano (EtFOSA), metilsulfonamida de perfluorooctanoetanol (MeFOSE), y etilsulfonamida de perfluorooctanoetanol (EtFOSE) en aire. El presente protocolo describe los métodos de preparación de las muestras, extracción, purificación y análisis de las sustancias perfluoroalquilos (PFAS) arriba mencionadas en agua, leche materna, suero humano y aire.

2 PRINCIPIO

Todos los PFAS deben ser extraídos de sus matrices porque la mayoría de los componentes de las matrices interfieren en la determinación final. Se puede hacer la extracción de las muestras de leche materna y suero humano utilizando la extracción en fase sólida (SPE, por su sigla en inglés) en una columna Wax. Primero se extraen las muestras de aire (en espumas de poliuretano) mediante la extracción Soxhlet y luego se las purifica. El análisis instrumental de los extractos limpios de todas las muestras se realiza utilizando cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS/MS por sus siglas en inglés) luego de lo cual se puede identificar y cuantificar todos los compuestos de interés.

3 PRECAUCIONES

Antes de comenzar el análisis y la preparación de los materiales necesarios es esencial tomar un par de precauciones.

1. Hay varios instrumentos, como el sistema de cromatografía líquida/ espectrometría de masa (LC/MS) y el sistema de agua ultrapura que suelen contener Teflón. Sin embargo, el Teflón contiene PFAS, y estos provocan una concentración de base elevada y distorsionan la determinación de los PFAS en las muestras. Por lo tanto, hay que cambiar las tuberías de Teflón de los materiales de LC y el Teflón en el sistema de agua ultrapura, o bien utilizar agua de grado HPLC para todas las soluciones en agua. Es preciso analizar la contaminación de los

blancos de los disolventes y materiales utilizados durante el análisis para probar que no contengan ningún PFASde interés.

2. El presente protocolo describe el análisis de PFAS. No obstante, es posible cambiar algunos de los parámetros y las condiciones analíticas descritas para este protocolo, y aun así obtener los mismos resultados. Si se dieran esos cambios, habría que optimizar y validar la totalidad del método para garantizar la comparabilidad de los datos.

4 MATERIALES Y REACTIVOS

4.1 Materiales

Botella de polietileno de alta densidad (100 y 500 ml)
Pipetas plásticas
Tubos de polipropileno (15 ml)
Micro tubos (1,5 ml)
Vial de polipropileno con tapón de rosca (700 µl)
Precinto de aluminio de plata 11 mm, PTFE/Revestimiento de caucho
Taponadora/Destapadora
Baño ultrasónico
Desecador al vacío
Muestreador pasivo
Balanza (precisión 0,01 g)
Pipetas (50, 100 y 200 µL)
Centrífuga
Estufa (37 °C)
Aparato de SPE (enjuagar con metanol yaguaantes de usar)
Medidor de pH
Bomba de vacío
Baño María (50 °C)
Agitador tipo vórtex
LC-MS/MS (LC-QQQ). Fuente de electrospray (ESI) con polaridad negativa
Columna FluoroSEP-RP Octil, 15 cm x 2,1 mm, tamaño de partículas: 5 µm, ES Industries (132211-FO)
2 x columnas Symmetry C₁₈, 20 mm x 3,9 mm, tamaño de partículas: 5 µm, Waters (WAT054225)
Columna Symmetry C₁₈, 50 mm x 2,1 mm, tamaño de partículas: 5 µm, Waters (18600206)

4.2 Reactivos

Disco de espuma de poliuretano (PUF), 14 cm x 1,35 cm, área de superficie 365 cm², masa 4,40 g, volumen 207 cm³, Tisch Environmental, Cleves, OH
Acetona, Ultraresi, J.T.Baker (9254)
Éter de petróleo, J.T.Baker
Metanol, calidad gradiente HPLC, J.T.Baker (8402)
Patrón interno (¹³C₄ PFOS + ¹⁸O₂ FOSA + ²H₃ MeFOSA + ²H₅ EtFOSA + ²H₇ MeFOSE + ²H₉ EtFOSE) en metanol (100 ng/ml)
Patrón interno (¹³C₄ PFOS + ¹⁸O₂ FOSA) en metanol (100 ng/ml)
Ácido fórmico al 50% enagua
Cartucho de SPE, Oasis WAX 6cc, Waters 186002493
Amoníaco 25% pureza p.a.

NH₄OH al 0,1% en metanol; adicionar 400 µl de amoníaco a 100 ml de metanol

NH₄OH al 0,2% en metanol; adicionar 8 ml de amoníaco a 92 ml de metanol

HPLC agua, HPLC analizada, J.T. Baker (4218), o pureza MilliQ

Ácido acético al 100 % pureza pro análisis (p.a.)

Acetato de amonio pureza p.a.

Acetato de amonio 25 mM; adicionar 190 mg de acetato de amonio a 100 ml de agua y ajustar el pH a pH=4 con ácido acético

Gas nitrógeno. Pureza 5,0

Patrón de inyección (1) (¹³C₈ PFOS) en metanol/agua (1:1, v/v) (150 ng/ml)

Patrón de inyección (2) (¹³C₈ PFOS) en metanol/agua (1:1, v/v) (50 ng/ml)

Patrón de inyección (3) (¹³C₈ PFOS) en metanol/agua (1:1, v/v) (25 ng/ml)

Formato de amonio, (>99%), Fluka (09735)

Buffer de formato de amonio 5 mM: Disolver 315 mg de formato de amonio en 1 l de agua HPLC. Filtrar antes de su uso.

Soluciones de calibración de PFAS (0,05, 0,25, 0,5, 5, 50, 100 ng/ml) en metanol/agua (1:1, v/v)

5 MÉTODO

5.1 Preparación de la muestra

5.1.1 Aire

Para muestreo del aire, se utiliza un disco de espuma de poliuretano (PUF).

5.1.1.1 Preparación del PUF

- Limpieza de un PUF:
 - De ser necesario, lavar PUF en agua;
 - Realizar una extracción Soxhlet en el PUF con acetona (24 h), seguida de extracción con éter de petróleo (24 h)
 - Secar el PUF en un desecador (24 h).

5.1.1.2 Muestreo de aire

Colocar un PUF en un muestreador pasivo durante tres meses en un lugar de muestreo en exteriores.

5.1.1.3 Preparación de las muestras

- Retirar el PUF del muestreador;
- Adicionar 150 µl de Patrón Interno (P.I.) al PUF.

5.1.1.4 Blanco de procedimiento

Preparar un PUF de la forma arriba descrita sin el tiempo de exposición durante el muestreo.

5.1.2 Agua

5.1.2.1 *Muestreo del agua*

Los aspectos relacionados con el muestreo del agua se describen en “Análisis de PFOAS en agua para el Plan de Monitoreo Global del Convenio de Estocolmo” del grupo de trabajo PNUMA GMP (PNUMA 2015b).

5.1.2.2 *Preparación de la muestra*

- Tan pronto como llega la muestra al laboratorio de análisis, se debe agregar patrones internos (P.I.) para compensar las pérdidas de los equipos de laboratorio por absorbancia. Por más detalles sobre la adición de patrones a las muestras, referirse a la sección 4.2. La muestra (incl. P.I.) debe tener tiempo como para equilibrarse antes de realizar los análisis.
- Conservar las muestras de agua (500 ml) en polietileno de alta densidad (HDPE) en el refrigerador o congelador (-20 °C) y descongelarlas el día antes del análisis;
- Agitar el agua rigurosamente antes de retirar las submuestras;
- Pesar 100 ml de la muestra de agua en una botella de HDPE (100 ml);

5.1.2.3 *Blanco para los procedimientos*

Prepare una muestra del blanco para los procedimientos tal como se describe arriba en la descripción de la muestra, utilizando agua ultralimpia (MilliQ) como sustituto de la muestra.

5.1.3 Leche materna y suero humano

5.1.3.1 *Muestreo en humanos*

Siga el protocolo de PNUMA/OMS para muestreo de leche materna ‘UNEP-coordinated Survey of Mothers’ Milk for Persistent Organic Pollutants’ (<http://www.unep.org/chemicalsandwaste/portals/9/POPs/docs/Mothers%20milk%20guide%20POPs.pdf>)

5.1.3.2 *Preparación de la muestra*

- Homogenizar las muestras (50 ml) manualmente agitando durante 1 min;
- Pesar 1 ml de la muestra de leche, o 0.5 ml de la muestra de sangre en un tubo PP (15 ml);
- Adicionar 50 µl de P.I. (4.2);
- Adicionar 2 ml de ácido fórmico al 50% y agitar manualmente;
- Colocar la muestra en un baño ultrasónico durante 15 min;
- Centrifugar durante 15 min a 3.000 rpm;
- Colocar las muestras en una estufa a 37 °C durante 30 min.

5.1.3.3 Blanco del procedimiento

Preparar una muestra del blanco del procedimiento tal como se describe arriba en la descripción de la muestra utilizando agua ultra limpia (MilliQ) como sustituto de la muestra.

5.2 Extracción de la muestra

5.2.1 Aire

- Realizar una extracción Soxhlet con metanol (12 h);
- Concentrar el extracto hasta 1 ml usando ya sea el rotavapor o Kuderna-Danish;
- Filtrar el extracto a través de un filtro de polipropileno de vidrio (GHP, por sus siglas en inglés) de 0,2 µm en una ampolleta de LC (cromatografía líquida) de polipropileno;
- Concentrara 200 µl bajo un chorro suave de nitrógeno;
- Adicionar 100 µl del patrón de inyección 1 (ver la sección 4.2);
- Adicionar 300 µl de acetato de amonio 2mM y agitar manualmente;
- Analizar con LC-MS/MS (ver el Capítulo **Error! Reference source not found.**).

5.2.2 Agua, leche maternay suero humano

- Se utiliza extracción de fase sólida (SPE) para la extracción de agua, leche materna y sangre. Instalar un cartucho de SPE en el aparato de SPE.
- Acondicionar el cartucho de SPE adicionando las soluciones de la Tabla 1 al cartucho, uno tras otro, en cuanto la solución anterior se haya hundido en el cartucho (no usar la bomba de vacío en este paso);

Tabla 1: Soluciones utilizadas para acondicionar el cartucho de SPE

	Agua		Leche y sangre	
	Cantidad (ml)	Concentración (%)	Cantidad (ml)	Concentración (%)
NH ₄ OH en metanol	4	0.1	2	2
Metanol	4		2	
Milli-Q H ₂ O	4		2	

- Adicionar el extracto de la muestra a la columna de SPE (razón de flujo máx. 1 gota/segundo);
- Lavar el cartucho de SPE adicionando las soluciones de la Tabla 2.

Tabla 2: Soluciones usadas para lavar el cartucho de SPE

	Agua Cantidad (ml)	Leche y sangre Cantidad (ml)
Acetato de amonio 25 mM (ajustado a pH=4 con ácido acético)	4	2
40% metanol en agua		2

- Secar el cartucho encendiendo la bomba de vacío. Eluir los PFAS del cartucho de SPE adicionando las soluciones de la Tabla 3.

Tabla3: Soluciones utilizadas para extraer PFAS del cartucho de SPE

	Agua		Leche y sangre	
	Cantidad (ml)	Concentración (%)	Cantidad (ml)	Concentración (%)
Metanol	4			
NH ₄ OH en methanol	4	0.1	1	2

- Evaporar el extracto hasta que esté seco en baño María a 50 °C con un chorro suave de nitrógeno;
 - Reconstituir el extracto de leche con 100 µl de solución de acetato de amonio y 100 µl del patrón de inyección 2 (ver la sección 4.2);
 - Reconstituir el extracto de leche con el extracto de sangre con 200 µl del patrón de inyección 3 (ver la sección 4.2);
- Agitar el extracto manualmente durante 1 min;
- Centrifugar durante 10 min a 3.000 rpm;
- Transferir el sobrenadante en una ampolla de polipropileno para LC y analizar con LC-MS/MS (ver la sección 7).

6 ANÁLISIS INSTRUMENTALES

Por favor, tener en cuenta que el gradiente y las configuraciones del espectrómetro de masas (MS) dependen del sistema de LC-MS/MS y del tipo de columnas utilizadas. Esas configuraciones deben optimizarse para los instrumentos y columnas internos. Hay que separar los isómeros lineales y ramificados de PFOS para cuantificarlos individualmente (Figura 1). Notar que la relación entre los isómeros lineales y los ramificados difiere significativamente entre las muestras, y que la Figura 1 es tan solo un ejemplo.

- Instalar la columna analítica (ver la sección 4.1) y la precolumna (ver la sección 4.1) en la HPLC;
- Instale una columna extra (50 mm) (ver la sección 4.1) y una precolumna (ver la sección 4.1) entre la bomba de LC y el inyector, para evitar la interferencia de PFAS, originando del Sistema de LC, con los compuestos objetivo;

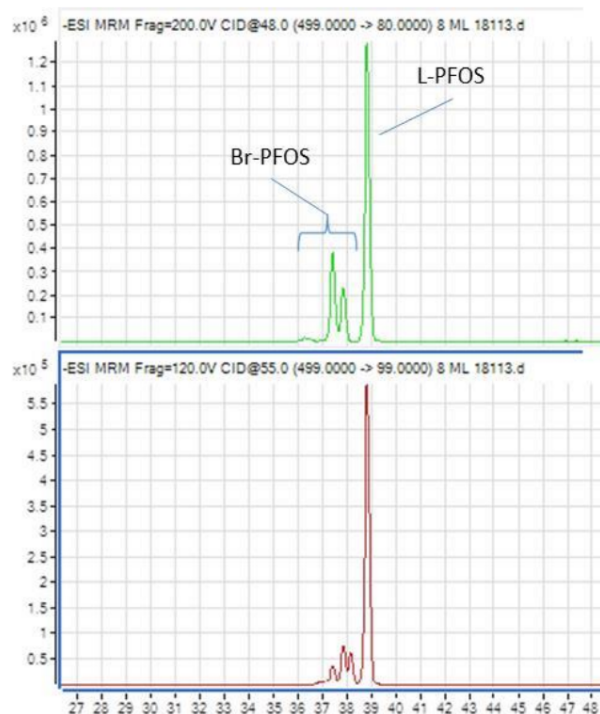


Figura1: Cromatograma que muestra la separación de los PFOS lineales y ramificados en agua (muestra de agua de superficie de Países Bajos)

- Tabla4);
- Encender la bomba con formato de amonioal 65% y metanol al 35%;
- Poner todos los extractos, blancos, y soluciones de calibración en la bandeja delMuestreador automático;
- Hacer una secuencia en la computadora (las configuraciones para la detección y cuantificación dePFASse presentan en laTabla5). Analizar las muestras, las soluciones de calibración, el material de referencia y los blancos en orden aleatorio;
- Inyectar una solución de calibración después que la bomba haya estado funcionando durante por lo menos 30 min;
- Verificar el rendimiento de LC-MS/MS comparando los resultados (tiempos de retención e intensidades de los picos) de la solución de calibración inyectada con los resultados anteriores;
- Iniciar la secuencia.

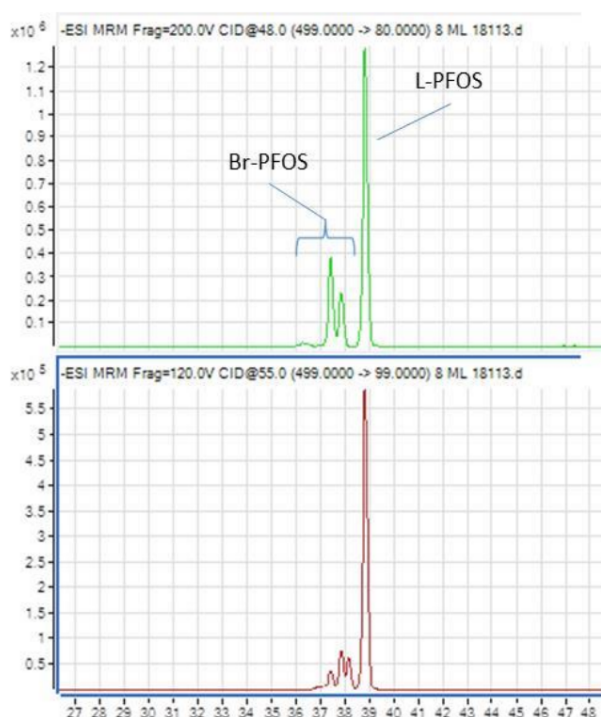


Figura1: Cromatograma que muestra la separación de los PFOS lineales y ramificados en agua (muestra de agua de superficie de Países Bajos)

Tabla4: Gradiente para la separación dePFAS

Tiempo (min)	Flujo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Formato de amonio (5 mM) (%)	Metanol (%)
0	300	65	35
2	300	65	35
35	300	25	75
45	300	5	95
55	300	5	95
55.5	300	65	35
65	300	65	35

7

CUANTIFICACIÓN

Identificar los picos meta en los cromatogramas de LC/MS basados en el tiempo de retención y la transición m/z. Utilizar las áreas pico de estos picos en las soluciones de calibración para trazar una curva de calibración para cada uno de los compuestos objetivo. Comparar las áreas de los picos de los mismos picos en las muestras contra las de la solución de calibración y calcular las concentraciones de losPFAS.

Nota: Las concentraciones de los PFAS deben reportarse sobre la base del peso húmedo. Sin embargo, a menudo los resultados se informan sobre la base del anión sulfonato, es decir, corregido por el peso molecular de la sal de PFOS. Por ejemplo, el peso molecular de la sal de sodio (PFOS-Na) es 522.11 g/mol y la sal Salt-M es 499.12. Por ende, al pesar y diluir las soluciones patrón se debe aplicar un factor de corrección de 0,96.

8 ASEGURAMIENTO DE CALIDAD/CONTROL DE CALIDAD

A los efectos del control de calidad, incluir un blanco y un material de referencia interno en cada serie de doce muestras máximo. Observar que estas configuraciones se aplican tanto a los isómeros lineales como ramificados.

Tabla5: Configuraciones de masa para separación dePFAS

Compuesto		lón precursor (m/z)	Producción (m/z)	Comentario
PFOS	Compuesto objetivo	499	80	Cuantitativo
			99	Cualitativo
¹³ C ₄ PFOS	Patrón interno	503	80	Cuantitativo
			99	Cualitativo
¹³ C ₈ PFOS	Patrón de inyección	507	80	Cuantitativo
			99	Cualitativo
FOSA	Compuesto objetivo	498	78	Cuantitativo
			169	Cualitativo
¹⁸ O ₂ FOSA	Patrón interno	502	82	Cuantitativo
			169	Cualitativo
MeFOSA	Compuesto objetivo	512	169	Cuantitativo
			219	Cualitativo
² H ₃ MeFOSA	Patrón interno	515*	169*	Cuantitativo
			219*	Cualitativo
EtFOSA	Compuesto objetivo	526	169	Cuantitativo
² H ₅ EtFOSA	Patrón interno	531*	169*	Cuantitativo
MeFOSE	Compuesto objetivo	602	45	Cuantitativo
² H ₇ MeFOSE	Patrón interno	609*	45*	Cuantitativo
EtFOSE	Compuesto objetivo	616	45	Cuantitativo
² H ₉ EtFOSE	Patrón interno	625*	45*	Cuantitativo

* Calculado, no optimizado

9 REFERENCIAS

UNEP (2015a): Guidance on the global monitoring plan for persistent organic pollutants.

UNEP/POPS/COP.7/INF/39, 26 February 2015, accessible from

<http://synergies.pops.int/2015COPs/MeetingDocuments/tabid/4243/language/en-US/Default.aspx>

UNEP (2015b): PFAS analysis in water for the Global Monitoring Plan of the Stockholm Convention, May 2015; accessible from www.unep.org/chemicalsandwaste/