

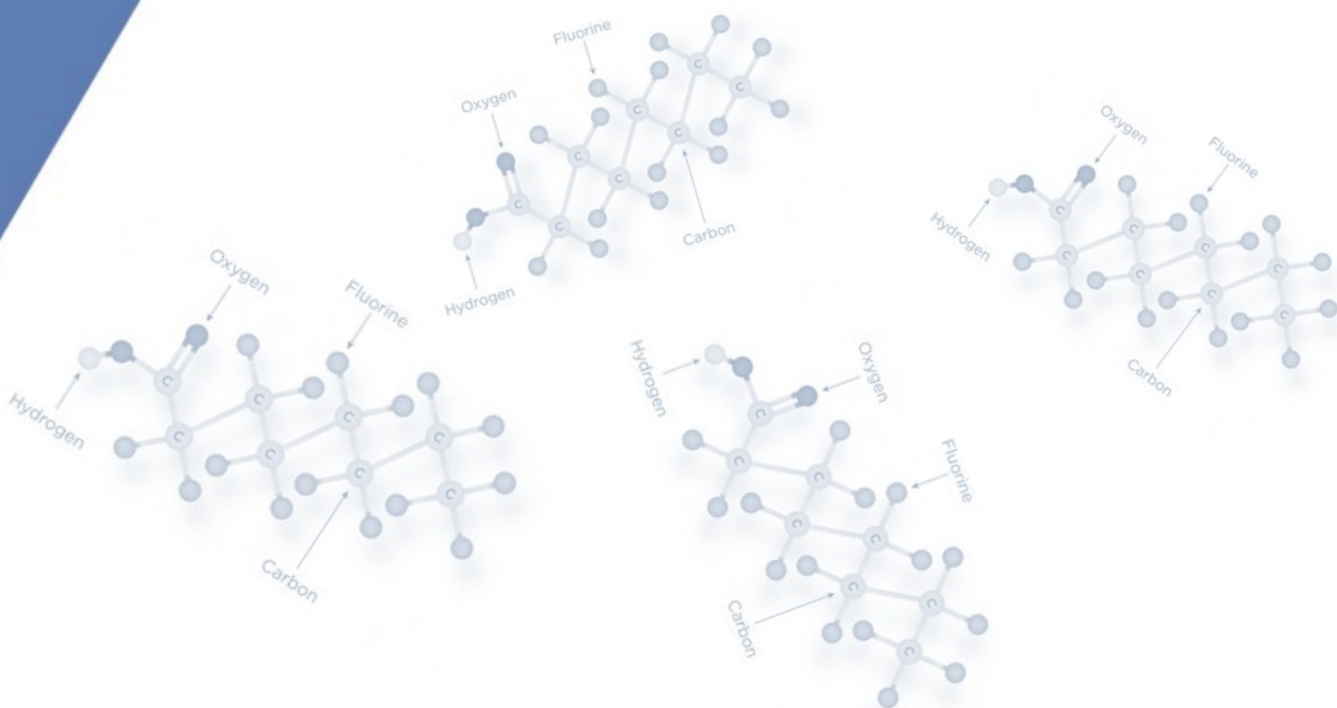


Plan de Monitoreo Global de Contaminantes Orgánicos Persistentes

Protocolo 3

Protocolo para el análisis de éteres de difenilos polibromados (PBDE) en leche materna, aire y suero humano

Noviembre de 2013



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

**Protocolo3:
Protocolo para el análisis de éteres de difenilos polibromados (PBDE) en leche materna, aire y suero humano**

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

Ginebra

Noviembre de 2013

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.

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.

En el artículo 16 del Convenio de Estocolmo (<http://chm.pops.int/Convention/ConferenceoftheParties/COP/Meetings/COP5/COP5Documents/tabid/1268/Default.aspx>) el Plan de Monitoreo Global (GMP) estableció el análisis de los contaminantes orgánicos persistentes (COP) en matrices pertinentes. Se hace necesario contar con un protocolo que garantice que estos compuestos se analicen siempre correctamente y de la misma manera.

Este procedimiento cubre éteres de difenilos polibromados (PBDE). El presente protocolo describe los métodos de preparación, extracción, purificación y análisis de ocho PBDE recomendados para el análisis (ver Tabla 1) en leche materna, suero humano y aire, conforme lo establecido por el GMP.

Tabla 1: Congéneres de PBDE a analizar con el protocolo de base

Número del congénere de PBDE	Estructura	Matriz principal pertinente
17	Éter de 2,2',4- tribromodifenilo	Opcional: Aire
28	Éter de 2,4,4'- tribromodifenilo	Opcional: Aire
47	Éter de 2,2',4,4'- tetrabromodifenilo	Aire, leche/suero humanos
49	Éter de 2,2',4,5'- tetrabromodifenilo	
99	Éter de 2,2',4,4',5- pentabromodifenilo	Aire, leche/suero humanos
100	Éter de 2,2',4,4',6- pentabromodifenilo	Opcional: Aire, leche/suero humanos
153	Éter de 2,2',4,4',5,5'- hexabromodifenilo	Aire, leche/suero humanos
154	Éter de 2,2',4,4',5,6'- hexabromodifenilo	Aire, leche/suero humanos
183	Éter de 2,2',3,4,4',5,6'- heptabromodifenilo	Aire, leche/suero humanos

2 PRINCIPIO

Todos los PBDE deben ser liberados de sus matrices porque la mayoría de los componentes de las matrices interfieren en la determinación final. Se puede extraer los PBDE de las muestras de leche materna utilizando la extracción líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés), de las muestras de aire (en espumas de poliuretano (PUF por sus siglas en inglés)) con extracción Soxhlet, y de las muestras de suero humano con extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés). La purificación de todos los extractos puede realizarse en una columna de sílice ácido, seguida de purificación en una columna de sílice desactivado al 1,5% (p/p). El análisis instrumental de los extractos limpios de todas las muestras se realiza mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (de baja resolución) (GC-MS), 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. Es preciso analizar la contaminación de los blancos de los disolventes y materiales utilizados durante el análisis para probar que no contengan ningún PBDE de interés.
2. El presente protocolo describe el análisis de PBDE. No obstante, es posible cambiar algunos parámetros y condiciones analíticas descritas en 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

Balanza (precisión: 0,01 g)

Matraz de base redonda (1 L)

Agitador

Desecador a vacío

Estufas (37 °C y 140 °C)

Agitador tipo vórtex

Frasco de vidrio (15 ml)

Tubo de vidrio (20 ml)

Pipeta (100 µL)

Refrigerador (4 °C)

Instrumental de vidrio Kuderna-Danish (KD)

Muestreador pasivo para discos de espuma de poliuretano (PUF)

Gránulos de ebullición, lavados con acetona y tolueno

Instrumental de vidrio Soxhlet y estufa eléctrica o baño María

Baño ultrasónico

Aparato de SPE

Tubos colectores (20 ml)

Columnas de vidrio con fritas de vidrio de 22 cm x 20 mm de diámetro interno (d.i.)

Columnas de vidrio para gel de sílice de 15 cm de largo x 11 mm de d.i.

Lana de vidrio silanizada, J.T. Baker, Deventer, Países Bajos

Pipetas Pasteur

Vial de vidrio para cromatografía de gases (2 ml)

Taponadora/ destapadora

Precinto, aluminio de plata 11 mm, PTFE/ Revestimiento de caucho

Columna capilar, CP-sil-8CB, sílice fundido WCOT (Columnas tubulares con pared recubierta), diámetro interno (D.I) 50 µm x, Película de 0,25 µm x 0,25 µm, Varian

4.2 Reactivos

H₂SO₄, 95-97%, pro análisis, Sigma Aldrich 30743, Steinheim, Alemania

Gel de sílice 60 (0,063 mm-0,200 mm), Merck 1.07734, Darmstadt, Alemania

Agua, desmineralizada

Acetona, Ultraresi, J.T. Baker, Deventer, Países Bajos

Tolueno, grado de reactivo analítico, pro análisis, Fisher Chemical, Loughborough, Leicestershire, RU

IsooctanoSuprasolv™, Producto de Merck No 1.15440, Darmstadt, Alemania

Solución madre BDE 58, Wellington, BDE-58, 50 µg/ml, Ontario, Canadá

Patrón interno (P.I.) (BDE 58) (100 ng/ml en isooctano)

P.I. (BDE 58) (100 ng/ml en acetona)

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, EE.UU.

n-Hexano, Ultra Resi-Analyzed, J.T. Baker 9262, via Avantor Performance Materials B.V., Deventer, Países Bajos

Ácido fórmico, 98-100%, Sigma Aldrich 27001, Steinheim, Alemania

2-propanol, LC-MS Chromasolv®, Fluka 34965, Steinheim, Alemania

Ácido fórmico/ 2-propanol (4:1, v/v)

Agua/2-propanol (4:1, v/v)

Solución de oxalato, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania

Solución de oxalato de sodio 0,15 M

Metanol, calidad gradiente para HPLC, J.T. Baker, Deventer, Países Bajos

Éter de dietilo (DEE), pro análisis, Merck Emsure® 1.00921, Darmstadt, Alemania

Heptano, J.T. Baker, Deventer, Países Bajos

Diclorometano (DCM), Picogrado, Promochem SO-1185, via LGC Standards, Wesel, Alemania

Cartuchos SPE: Cartuchos de extracción de SPE hechos a medida Oasis® HLB (540 mg/3 ml), Waters producto No 186003852, Milford Massachusetts, EE.UU.

DCM/ metanol (7:3, v/v)

Agua/ metanol (19:1, v/v)

Agua/ 2-propanol (7:3, v/v)

Agua/ metanol (3:7, v/v)

Gas nitrógeno

Hexano/ DCM (3:1, v/v)

Na₂SO₄ anhidro, pro análisis; calentado durante 16 horas a 250 °C

Hexano/ DCM (7:3, v/v)

DEE en hexano (15%, v/v)

Solución de PBDE (Solución de PBDE de Wellington, concentración: 1000-5000 ng/ml), BDE-MXE, Wellington, Ontario, Canadá

Solución de calibración: Solución de PBDE diluida 5, 10, 20, 50, 225, 550, 1000 y 2500 veces

4.3 Instrumentación

GC-MS con ionización negativa por captura de electrones (ECNI), Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos:

GC: 6890N

Inyector: 7683B

MSD: 5975 inertXL MSD

Ionización química (CI) bron: G3170-65403 (kit)

Impacto electrónico (EI) bron: G2591-64710 (kit)

Software paraintegración, manejo y almacenamiento de datos, Agilent Chemstation, Versión E.02.00.493, Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos

5 PREPARACIÓN DE SÍLICE ÁCIDO Y SÍLICE DESACTIVADO

5.1 Preparación de sílice ácido (40% H₂SO₄ (p/p))

- Utilizar una balanza de precisión para adicionar, en unmatraz de fondo redondo de 1 l, 200 g de H₂SO₄ a 300 g degel de sílice;
- Homogenizar la mezcla agitando manualmente hasta que no se vean más grumos mayores de aproximadamente 1 cm³;
- Luego, agitar elgel de síliceen un agitador unas pocas horas; y
- Almacenar en un desecador toda la noche.

5.2 Preparación de sílice desactivado con agua al 1,5%

- Adicionar aproximadamente 0,5 kg degel de sílice a unmatraz de fondo redondo;
- Calentar elgel de síliceen una estufa a 140 °C durante 1 noche;
- Dejar enfriar elgel de sílicehasta llevarlo a temperatura ambiente en un desecador;
- Agregar 1,5 g de agua desmineralizada a 98,5 g de gel de sílice;
- Homogenizar la mezcla agitando manualmente hasta que no se vean grumos mayores de aproximadamente 1 cm³;
- Luego, agitar elgel de síliceen un agitador unas pocas horas; y
- Conservar en un desecador toda la noche.

6 MÉTODO

6.1 Preparación de la muestra

Nota: ¡Todo el instrumental de vidrio debe enjuagarse con acetona antes de su uso!

6.1.1 Leche materna

- Acondicionar las muestras de leche materna (25 ml) en una estufa a 37 °C durante 2 h;
- Colocar en agitador tipo vórtex las muestras durante 1 min;
- Pesar 5 ml de leche en un tubo de vidrio vacío (20 ml);
- Adicionar 100 µl de P.I. (100 ng/ml en isooctano); y
- Mantener las muestras en el refrigerador hasta el día siguiente.

6.1.2 Aire

Para el muestreo del aire se utilizan discos PUF.

6.1.2.1 *Preparación del PUF*

- Pre limpieza de un PUF:
 - Realizar una extracción Soxhlet en el PUF con acetona (24 h), seguido de hexano (24 h);
 - Secar el PUF y almacenar en un desecador (24 h).

6.1.2.2 *Muestreo del aire:*

- Colocar un PUF en un muestreador pasivo durante tres meses en un lugar de muestreo en exteriores. Evitar cualquier posibilidad de contaminación por las manos (usar guantes), etc.

6.1.2.3 *Preparación de la muestra de aire:*

- Retirar el PUF del muestreador; y
- Agregar 100 µl de P.I. (100 ng/ml en isooctano) al PUF.

6.1.3 Suero humano

- Homogenizar las muestras de suero humano (10 ml) agitando manualmente durante 1 min;
- Pesar 5 ml de la muestra de suero humano en un frasco de vidrio (15 ml);
- Agregar 100 µl de P.I. (100 ng/ml en acetona);
- Colocar en agitador tipo vórtex las muestras durante 1 min;
- Mantener la muestra de suero durante una noche a 4 °C;
- Acondicionar las muestras a temperatura ambiente;
- Agregar 5 ml de ácido fórmico/ 2-propanol (4:1, v/v);

- Colocar en agitador tipo vórtex y sonicar durante 5 min;
- Colocar las muestras a oscuras durante 50 min para dejar que las proteínas se desnaturalicen;
- Agregar 5 ml de agua/2-propanol (4:1, v/v); y
- Colocar en agitador tipo vórtex y sonicar durante 5 min;

6.2 Extracción de la muestra

Nota: ¡Asegurarse de enjuagar todo el material de vidrio con acetona antes de usarlo!

6.2.1 Leche materna

- Uno tras otro, agregar a la muestra:
 - 2.5 ml de una solución de oxalato de sodio 0,15 M
 - 5 ml de metanol
 - 5 ml de DEE
 - 5 ml de n-heptano.
- Agitar el tubo de muestra con cuidado entre la adición de cada uno de los disolventes;
- Si se formaran emulsiones entre las dos fases, agregar pequeñas cantidades de metanol hasta producir su disrupción.
- Transferirla capa superior, orgánica a un matraz KD;
- Repetir la extracción dos veces más. Primero agregando uno tras otro 5 ml de DEE y 5 ml de n-heptano, y luego agregando 3 ml de cada uno;
- Transferir la fase orgánica al mismo matraz KD entre cada extracción;
- Agregar 1 ml de iso-octano y 2 gránulos de ebullición;
- Concentrar el extracto a 1 ml utilizando o bien un evaporador rotatorio (rotavapor) o KD. Si se usa un rotavapor, asegúrese que se mantenga limpio enjuagando minuciosamente el refrigerante entre las muestras.

6.2.2 Aire

- Hacer una extracción Soxhlet del PUF con DCM (12 h);
- Agregar 1 ml de iso-octano y concentrar el extracto a 1 ml usando un rotavapor o KD.

6.2.3 Suero humano

Para la extracción del suero se utiliza SPE.

- Instalar un cartucho de SPE en el aparato de SPE;
- Lavar el cartucho de SPE con 3 ml de metanol seguido de 3 ml de DCM/ metanol (7:3, v/v) con un flujo de 1,5 ml/min;
- Acondicionar el cartucho de SPE con 5 ml de metanol seguido de 5 ml de agua/ metanol (19:1, v/v) con un flujo de 1,5 ml/min;
- Agregar el extracto de la muestra (15 ml) al cartucho de SPE con un flujo de 0,4 ml/min;

- Agregar 5 mlde agua/ metanol (19:1, v/v) alcartucho de SPE con un flujo de 0,4 ml/min;
- Lavar elcartucho de SPE con 10 mlde agua/ 2-propanol (7:3, v/v) con un flujo de 1,5 ml/min;
- Secar el cartucho durante 45 min bajo un vacío de 38 kPa;
- Limpiar el cartucho con 3 veces 20 µL agua/metanol (3:7, v/v);
- Eluir el PBDE del cartucho en un tubo colector limpio (20 ml) con 12 mlde DCM/ metanol (7:3, v/v) con un vacío de 8 kPa;
- Una vez que hayan desaparecido los 12 mlde DCM/metanol en el cartucho, dejar que la presión aumente hasta 20 kPa durante 10 segundos para eluir el solvente restante;
- Agregar 1mlde iso-octano al extracto;
- Concentrar el extracto a aproximadamente 500 µL en baño María (máx. 40 °C) bajo un flujo de nitrógeno; y
- Agregar hexano/ DCM (3:1, v/v) al extracto hasta llegar a 1 ml.

6.3 Purificación de la muestra

6.3.1 Leche materna, aire, y suero humano

La purificación de la muestra de extractos de leche materna, aire y suero humano consta de dos pasos. El primer paso consiste en la limpieza en una columna de sílice ácido. El segundo paso consiste en limpiar en una columna de sílice desactivada de 1,5% (p/p).

6.3.1.1 *Purificación en una columna de sílice ácido*

- Preparar una columna de sílice ácido (con una membrana de frita vítrea) con 20 g de H₂SO₄-silicioal 40% (ver la sección 5.1) seguido de 1 cm de Na₂SO₄. Hacer vibrar la columna entre una adición y otra hasta que no haya burbujas visibles;
- Enjuagar la columna con 25 mlde hexano/ DCM (7:3, v/v);
- Llevar el extracto de la muestra a la parte superior de la columna;
- Enjuagar el tubo de la muestra 2 veces con 1 mlde hexano/ DCM (7:3, v/v);
- Colocar un matraz de KD bajo la columna;
- Eluir el PBDE de la columna con 75 mlde hexano/ DCM (7:3, v/v);
- Adicionar 1 mlde isooctano y 2 gránulos de ebullición al matraz KD; y
- Concentrar el extracto hasta 1 ml usando un rotavapor KD.

6.3.1.2 *Purificación en una columna de sílice al 1,5 % (m/m) desactivado*

- Preparar una columna de sílice desactivado al 1,5 % (p/p), llenando una columna de vidrio con 1,8 g de sílice desactivado con agua al 1,5% (ver 5.2) seguido de 1 cm de Na₂SO₄.
- Hacer vibrar la columna entre una adición y otra hasta que no haya burbujas visibles;
- Adicionar 6 mlde hexano para acondicionar la columna;
- Adicionar el extracto de la muestra a la columna en cuanto el menisco llegue a la capa de Na₂SO₄;
- Colocar un matraz KD bajo la columna en cuanto todo el extracto se haya hundido en la columna;

- Enjuagar el tubo del extracto tres veces con 1 ml de hexano y agregarlo a la columna;
- Eluir con 11 ml de hexano seguido de 12 ml de DEE en hexano (15%, v/v);
- Después de recoger todos los eluatos, adicionar 1 ml de iso-octano y 2 gránulos de ebullición en el matraz de KD;
- Concentrar el extracto a 500 µL usando ya sea un rotavapor o KD; y
- Transferir el extracto en un vial de vidrio de GC y analizar con GC-MSD (modo ECNI) (ver la Sección 7).

7. ANÁLISIS INSTRUMENTALES

Por favor, tener en cuenta que el gradiente y las configuraciones de MS dependen del sistema de GC-MS y del tipo de columnas utilizadas. Esas configuraciones deben optimizarse para los instrumentos y columnas internos.

- Instalar la columna analítica;
- Afinar el MS. Si el afinado no está funcionando, hay que limpiar la fuente;
- Verificar el sistema haciendo una verificación señal a ruido para cada PBDE, inyectando la solución de calibración con la menor concentración;
- Hacer un método en el software para el análisis de PBDE. Las configuraciones para la separación y detección en un GC-ECNI-MS se presentan en la Tabla 2;
- Colocar todos los viales con extractos, blancos, y soluciones de calibración en la bandeja del Muestreador automático;
- Hacer una secuencia en la computadora, las soluciones de calibración, el blanco y el material de referencia en orden aleatorio; y
- Iniciar la secuencia.

Tabla 2: Configuraciones para los análisis de PBDE en una GC-ECNI-MS

Columna:	Columna capilar, CP-sil-8CB, sílice fundido WCOT, 50 m x diámetro interno (D.I.) 0,25 mm x Película 0,25 µm, Varian
Volumen de inyección:	1 µL
Modo de inyección:	Splitless pulsado
Gas portador:	Helio
Flujo inicial nominal:	2,6 ml/min
Gas de afinado:	Metano

8. CUANTIFICACIÓN

Existen programas de software para identificación y cuantificación como Chemstation, Masshunter, etc.

Utilizar el software para identificar los picos metaen los cromatogramas de GC/MS según el tiempo de retención (TR) y la transición m/z (ver en laTabla3las configuraciones para la detección de PBDE y la cuantificación después de la separación en una columnaCP-Sil-8CB).

Utilizar las áreas de los picos en las soluciones de calibración para trazar una curva de calibración de cada uno de los compuestosobjetivo. Comparar las áreas de los picos y tiempos de retención de los picos en la solución de calibración con los de los picos de las muestras y calcular las concentraciones de PBDE.

Tabla3: Configuración de GC/MS para la separación de PBDE en una columna CP Sil-8CB

Compuesto	Descripción	m/z	RT (min)
BDE 17	Compuesto objetivo	79	18.7
BDE 28	Compuesto objetivo	79	19.2
BDE 47	Compuesto objetivo	79	30.8
BDE 49	Compuesto objetivo	79	29.0
BDE 99	Compuesto objetivo	79	38.0
BDE 100	Compuesto objetivo	79	36.7
BDE 153	Compuesto objetivo	79	42.7
BDE 154	Compuesto objetivo	79	41.3
BDE 183	Compuesto objetivo	79	47.5
BDE 58	P.I.	79	31.5

9. ASEGURAMIENTO DE CALIDAD/CONTROL DE CALIDAD

Para el control de calidad, incluir un blanco, una muestra duplicada y un material de referencia interno en cada serie de un máximo de 12 muestras. Se recomienda encarecidamente participar en los estudios interlaboratorio (EIL) y analizar los materiales de referencia certificados (CRM por su sigla en inglés) regularmente para garantizar la calidad de los análisis.

10. REFERENCIAS

UNEP (2013): Guidance on the global monitoring plan for persistent organic pollutants. UNEP/POPS/COP.6/INF/31, 4 de febrero, accesible en www.pops.int