

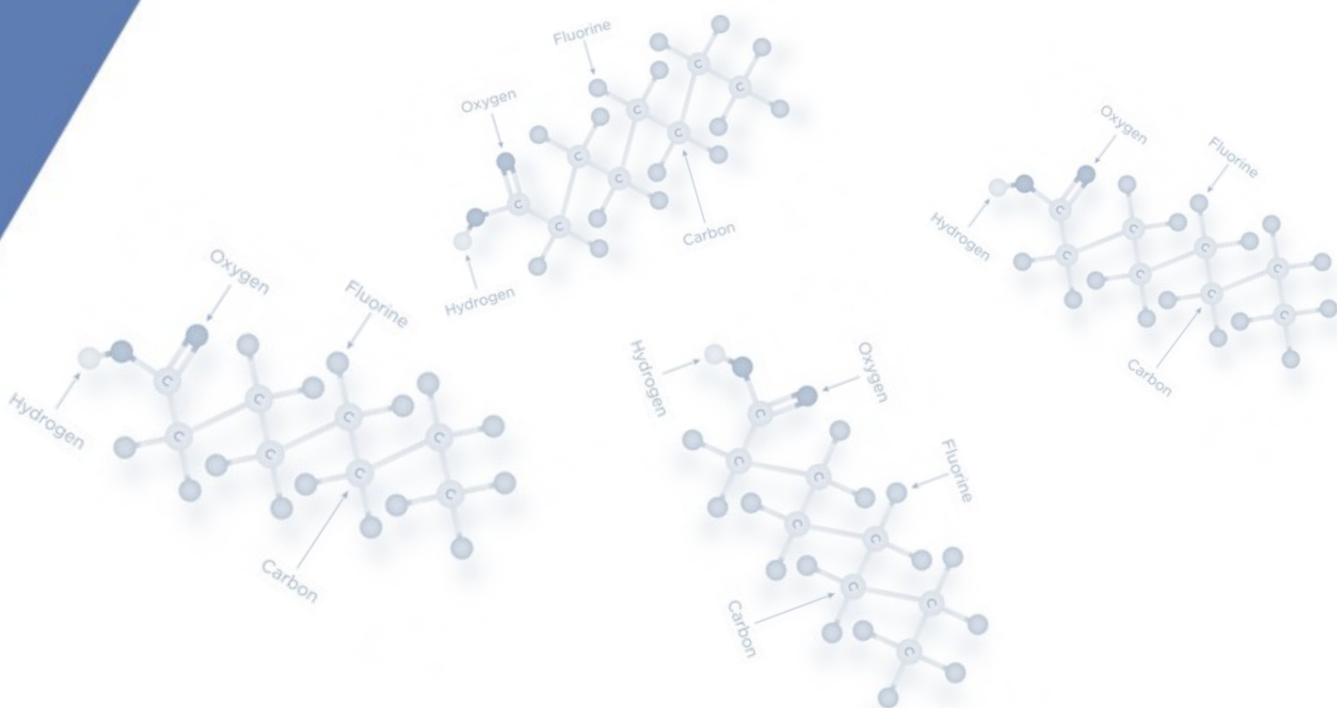


Plan de Monitoreo Global de Contaminantes Orgánicos Persistentes

Protocolo 5

Protocolo para el análisis de dibenzo-para-dioxinas policloradas, Dibenzofuranos policlorados (PCDD/PCDF) y bifenilos policlorados tipo dioxina (dl-PCB) en aire ambiental y tejidos humanos

Junio de 2015



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

Protocolo 5:

Protocolo para el análisis de dibenzo-para-dioxinas policloradas, Dibenzofuranos policlorados (PCDD/PCDF) y bifenilos policlorados tipo dioxina (dl-PCB) en aire ambiental y tejidos humanos

División Productos Químicos
Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA)
Economía División

Ginebra

Junio de2015

Este documento ha sido preparado por el:

Centro de Investigación MTM
Facultad de Ciencia y Tecnología
Universidad Örebro
SE-701 82 Örebro
Suecia

Para la:

División Productos Químicos
Economía División
Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA)

En el marco del Proyecto “Establecimiento de las herramientas y los métodos para incluir los nuevos COP en el Plan de Monitoreo Global”; ID del proyecto 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) y en él se enumeran los congéneres que se recomienda analizar en las matrices principales (ver el capítulo 2 de la “Guía para el Plan de Monitoreo Global de contaminantes orgánicos persistentes”, PNUMA 2013). Es preciso contar con un protocolo que garantice que estos compuestos siempre se analicen correctamente en diversos laboratorios y de la misma manera. Para ayudar en su tarea a los laboratorios que analizan COP, la División de Productos Químicos de la División de Tecnología, Industria y Economía (DTIE) del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente está elaborando procedimientos genéricos para el análisis de los COP originales y de los nuevos.

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

Este procedimiento cubre las dibenzo-para-dioxinas policloradas y los dibenzofuranos policlorados (PCDD/PCDF) y los bifenilos policlorados (PCB). El presente protocolo describe el método recomendado para la preparación, extracción, purificación y análisis de las muestras de diecisiete PCDD/PCDF y doce dl-PCB cuyo análisis se recomienda (ver la Tabla 1) en leche materna, plasma humano y aire.

Tabla 1: Congéneres de PCDD/PCDF y dl-PCB a analizar con el protocolo

Estructura	Matriz de referencia pertinente
2,3,7,8-TCDD	Aire, leche materna/tejidos
1,2,3,7,8-PnCDD	Aire, leche materna/tejidos
1,2,3,4,7,8-HxCDD	Aire, leche materna/tejidos
1,2,3,6,7,8-HxCDD	Aire, leche materna/tejidos
1,2,3,7,8,9-HxCDD	Aire, leche materna/tejidos
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	Aire, leche materna/tejidos
OCDD	Aire, leche materna/tejidos
2,3,7,8-TCDF	Aire, leche materna/tejidos
1,2,3,7,8-PnCDF	Aire, leche materna/tejidos
2,3,4,7,8-HxCDF	Aire, leche materna/tejidos
1,2,3,4,7,8-HxCDF	Aire, leche materna/tejidos
1,2,3,6,7,8-HxCDF	Aire, leche materna/tejidos
2,3,4,6,7,8-HxCDF	Aire, leche materna/tejidos
1,2,3,7,8,9-HxCDF	Aire, leche materna/tejidos
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	Aire, leche materna/tejidos
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	Aire, leche materna/tejidos
OCDF	Aire, leche materna/tejidos

Tabla2: Congéneres dePCB tipo dioxina a analizar con el protocolo

Número de congénere de PCB	Estructura	Matriz de referencia pertinente
Bifenilos policlorados sin sustitución <i>mono-orto</i>		
77	3,3',4,4'-tetraCB	Aire, leche materna/tejidos
81	3,4,4',5-tetraCB	Aire, leche materna/tejidos
126	3,3',4,4',5-pentaCB	Aire, leche materna/tejidos
169	3,3',4,4',5,5'-hexaCB	Aire, leche materna/tejidos
Bifenilos policlorados con sustitución <i>mono-orto</i>		
105	2,3,3',4,4'-pentaCB	Aire, leche materna/tejidos
114	2,3,4,4',5-pentaCB	Aire, leche materna/tejidos
118	2,3',4,4',5-pentaCB	Aire, leche materna/tejidos
123	2',3,4,4',5-pentaCB	Aire, leche materna/tejidos
156	2,3,3',4,4',5-hexaCB	Aire, leche materna/tejidos
157	2,3,3',4,4',5'-hexaCB	Aire, leche materna/tejidos
167	2,3',4,4',5,5'-hexaCB	Aire, leche materna/tejidos
189	2,3,3',4,4',5,5'-heptaCB	Aire, leche materna/tejidos

2 PRINCIPIO

Este método se utiliza para determinarPCDD/PCDFydl-PCBen leche materna, otras muestras biológicas, sedimento, gas de combustión, hollín y otras matrices abióticas.

Descripción del método: mediante métodos adecuados se homogeniza y extrae la muestra, y luego se aplica una estrategia de cromatografía de columnaen tres pasos.

Si la muestra contiene azufre, se lo debe extraer durante la limpieza. En esta aplicación, el método de elección es la remoción de azufre con cobre metálico.

Se homogeneizan las muestras y se realiza la extracción con un disolvente orgánico. Se limpia el extractopara retirar las grasas y otros contaminantes. Se realizan la identificación y la cuantificación mediante cromatografía de gases – espectrometría de masade alta resolución (HRMS, por su sigla en inglés] o triple cuádrupolo(MS/MS)). El método se basa en la dilución de isótopos, agregando patrones internos marcados con C¹³a la muestra y compensando por las pérdidas ocurridas durante la extracción de la muestra, limpieza y análisis.

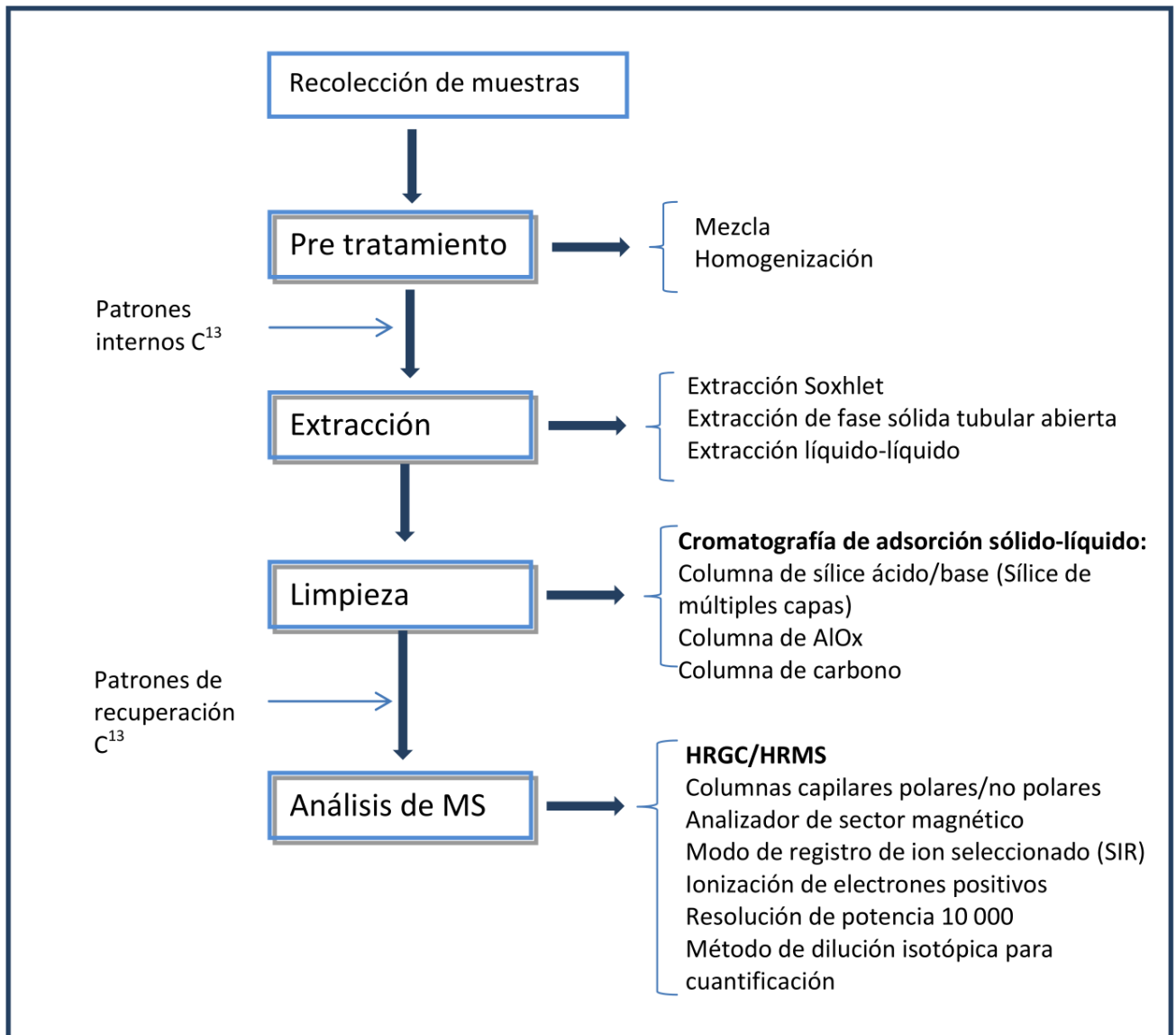


Figura1: Reseña general esquemática del principio analítico

3 PRECAUCIONES

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

1. Se debe analizar la contaminación de los blancos de los solventes y materiales utilizados durante el análisis para probar que no contengan ningún PCDD/PCDF o PCB de interés.
2. El presente protocolo describe el análisis de PCDD/PCDF y PCB. Sin embargo, es posible cambiar ciertos parámetros y condiciones analíticas descritas en este protocolo, y aun así obtener los mismos resultados. En caso de hacerse esos cambios, habría que optimizar y validar la totalidad del método para garantizar la comparabilidad de los datos.

4 MEDIDAS DE SEGURIDAD

Se recomienda ser cuidadoso, ya que los COP pueden ser carcinogénicos y pueden afectar el sistema inmunitario. Asimismo, es peligroso inhalar el gel de sílice seco. Los solventes del tipo del acetato de etilo, tolueno, diclorometano y *n*-hexano plantean peligro de incendio; son irritantes para la piel y constituyen un peligro ambiental. El ácido clorhídrico y sulfúrico concentrados son sumamente corrosivos para la piel. Al manipular estas sustancias químicas, se debe utilizar guantes de nitrilo y trabajar en una campana de gases. Los solventes utilizados se deben descartar en vasos marcados, especialmente diseñados para residuos de disolventes clorados y no clorados.

5 MATERIALES Y REACTIVOS

5.1 Materiales

Balanzas (precisión: 0,01 gy 0,0001)

Matraz de fondo redondeado (100ml, 250 mly 500 ml)

Desecador

Evaporador rotatorio

Estufas (130 °C)

Frascos de vidrio

Jeringa de Hamilton (25 µL)

Refrigerador (4 °C)

Muestreador de aire y muestras apiladas de gas: tubo adsorbente XAD o PUF, soportes y filtro de vidrio de partículas de 70 mm

Bomba de aire

Gránulos de ebullición, lavado con acetona y tolueno

Aparatos de vidrio Soxhlet y calentador eléctrico o baño María

Baño ultrasónico

Dispositivo SPE

Tubos de recolección (20 ml)

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

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

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

Pipetas Pasteur

Vial de vidrio para cromatografía de gases (2 ml)

Colocador de tapas/ destapador

Columna capilar, DB-5MS, sílice fundido WCOT, 30 m x diámetro interno (d.i.) 0.25 mm x película de 0.25 μm , J&W, Folsom, CA., EE.UU.

Columnas de Cape Technology

5.2 Reactivos

Sulfato de sodio anhidro, Na_2SO_4 , Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania

Hidróxido de potasio, KOH, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania

Gel de sílice, Grado 7731, tamaño del poro 60 Å, malla de 70-230, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania

Tetradecano, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania

n-Hexano, Suprasolv, Merck, Darmstadt, Alemania

Diclorometano, Fluka, Steinheim, Alemania

Tolueno, Fluka, Steinheim, Alemania

Etanol, 96% , Scharlau, Sentmenat, España

Metanol, Fluka, Steinheim, Alemania, Carbopack, malla C 80/100, Supelco Analytical, Bellefonte, EE.UU.

Celita 545, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania

Alúmina B, EcoChrom, MP Biomedicals, Eschwege, Alemania

Ácido sulfúrico, 95-97%, Merck, Darmstadt, Alemania

Disco de espuma de poliuretano (PUF), 14 cm x 1.35 cm, área superficial 365 cm^2 , masa 4.40 g, volumen 207 cm^3 , Tisch Environmental, Cleves, OH, EE.UU.

Adsorbente XAD-2 Tisch Environmental, Cleves, OH, EE.UU.

Gas nitrógeno

Solución de PCDD/PCDF (Wellington, Ontario, Canadá y Cambridge Isotopes Laboratories, Andover, MA, EE.UU.

Soluciones de calibración, ver la Sección 8.3.

5.3 Instrumentación

CG-HRMS con una resolución superior a 10.000. GC fabricada por Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos. MS fabricada por Waters, Milford, MA, Estados Unidos:

GG: 6890N

Inyector: 7683B

MS: Instrumento del sector magnético Autospec

Software para integración, manejo y almacenamiento de datos, MassLynx, Waters, Milford, MA, Estados Unidos.

6 PREPARACIÓN DE GELES DE SÍLICE

6.1 Gel de sílice

6.1.1 Gel de sílice neutro

Se vierte gel de sílice 60, con una malla de 70-230 (Merck) en una gran columna de vidrio con lana de vidrio en el fondo. Se lava el gel con dos volúmenes de metanol, seguido de dos volúmenes de diclorometano. Al evaporarse los solventes, el gel se transfiere a un gran vaso de vidrio y se activa a 130°C durante un mínimo de 24 horas antes de su uso. Se almacena el gel a 130°C.

6.1.2 Ácido sulfúrico al 40 por ciento (%) – gel de sílice

Agregar 150 g de gel de sílice activado y 100 g de ácido sulfúrico (Merck, p.a.) en un frasco. Poner la tapa y agitar el frasco hasta que el gel se haya secado. El gel se conserva a temperatura ambiente.

6.1.3 Ácido sulfúrico al 20 por ciento (%) – gel de sílice

Agregar 200 g de gel de sílice activado y 50 g de ácido sulfúrico (Merck, p.a.) en un frasco. Poner la tapa y agitar el frasco hasta que el gel se haya secado. El gel se conserva a temperatura ambiente.

6.1.4 Hidróxido de potasio – gel de sílice

Disolver cuidadosamente 84 g de hidróxido de potasio en 400 ml de metanol en un matraz de 2000 ml de fondo redondeado. Agregar 150 g de gel de sílice 60 sin lavar, malla 70-230 (Merck). Se coloca el matraz en un evaporador rotatorio al baño María a 55°C. No aplicar vacío. Tras 90 min, se transfiere el gel a la columna. El gel se lava con dos volúmenes de metanol y dos volúmenes de diclorometano. Transferir a un frasco con tapa después que se hayan evaporado los solventes. Almacenar el gel a temperatura ambiente.

6.2 Carbono activo – mezcla de Celita

Mezclar 3.6 g de carbono (Carbopack C malla 80-100, Supelco) con 16,4 g de Celita (545, Fluka) agitando vigorosamente en un matraz E de 250 ml. La mezcla se almacena en una secadora a temperatura ambiente.

7 MANEJO DE LAS MUESTRAS

Es importante adaptar los métodos de extracción y limpieza para reducir a un mínimo la degradación térmica y fotolítica. Es preciso ser muy cuidadoso al hacer todas las preparaciones para evitar la degradación fotolítica. Utilizar material de vidrio de color ámbar y/o cubrir el material de vidrio con papel de aluminio.

7.1 Homogenización

7.1.1 Muestra biológica

Las muestras se pesan y homogenizan junto con sulfato de sodio (NaSO_4 , Fluka) libre de agua, a una razón de 1+5. Si las cantidades son grandes (mayores de 10g) se utiliza una batidora, mientras que cuando las cantidades son pequeñas se homogenizan en un mortero. Todo el equipo utilizado se enjuaga entre las muestras con etanol, n-hexano y diclorometano, en ese orden. Todos los pesos de las muestras se registran en un protocolo de laboratorio. El homogenato se almacena en un congelador hasta la extracción.

7.1.2 Plasma

Antes de extraer el suero, se realiza una homogenización minuciosa. Esto se realiza invirtiendo la muestra, poniéndola boca abajo varias veces hasta que tenga un aspecto homogéneo.

7.2 Determinación de grasa

7.2.1 Tejido biológico

Para niveles bajos de muestras, por ej. grasa de ballena calderón:

Preparar una columna de 50 ml aplicando un pequeño tapón de lana de vidrio en el fondo. Transferir alrededor de 25 g-30 g de la muestra homogenizada a la columna de la pipeta. Eluir la grasa con 4 volúmenes de hexano/diclorometano 1/1 en un matraz con fondo pesado previamente (pesar el matraz antes de lavar). Dejar que el solvente se evapore (usando nitrógeno) y pesar el matraz con fondo hasta un peso constante. El contenido de grasa se calcula como:

Contenido de grasa (%) = $100 \times \text{peso de la grasa} / \text{peso de la muestra}$.

8 PROCEDIMIENTO

8.1 Adicionado

En este método se utiliza el Patrón interno (PI) de C^{13} , el Patrón de recuperación (PR) de C^{13} y el Patrón de Cuantificación (PC) de C^{12} . El método se basa en el supuesto que el patrón (PI) marcado y el analito presentan un comportamiento químico y físico idéntico en todas las etapas del análisis, lo que generalmente sucede para la limpieza, pero no necesariamente para la extracción. El PI se agrega a la muestra antes de la extracción y la limpieza, y el PR se adiciona directamente en el vial de CG. Comparando los niveles de PI y PR es posible compensar posibles errores de los usuarios. Los PC se utilizan para cuantificar los niveles en las muestras.

8.2 Manipulación de los patrones y mantenimiento de los protocolos de peso

Para cada patrón hay un protocolo en el que se registra el peso la última vez que se utilizaron los patrones. La próxima vez que se utilice el patrón hay que verificar si el peso coincide con el último registrado. Si el disolvente (habitualmente tolueno) se evapora, se debe adicionar más hasta obtener el peso correcto. Si los pesos resultaran más altos que los últimos especificados, se tiene que evaporar el disolvente. La evaporación se logra fácilmente soplando aire en el patrón con una pipeta Pasteur hasta obtener el peso deseado. La diferencia entre el último peso especificado y el nuevo peso verificado debería llegar como máximo a $\pm 0,0002$ g. Utilizar una nueva pipeta Pasteur para cada patrón.

La adición de las muestras se realiza con jeringas Hamilton. Hay distintas jeringas para los diferentes patrones. Se debe lavar la jeringa con n-hexano y tolueno antes y después de su uso (10 veces de cada uno). Luego de usar las jeringas, se repite este procedimiento antes de colocar las jeringas en sus receptáculos y de guardarlas en el armario.

Por cada diez muestras se prepara un patrón. Los patrones contienen patrón interno (PI) de los analitos objetivo, patrón de recuperación (PR) de los analitos objetivo, y una mezcla nativa de los analitos objetivo.

El tetradecano se usa como un "keeper" en los extractos de los patrones y las muestras. El químico determina la concentración y el volumen de los patrones a utilizar basándose en los niveles esperados en cada proyecto.

Es posible que varíen los patrones dependiendo de las matrices, los niveles y el propósito de los análisis. La figura a continuación muestra una sugerencia para el uso del PI, el PR y el PC.

Tabla3: Ejemplos para el uso de patrones internos, de recuperación y cuantificación

Grupo de COP	PI	PR	PC
dl-PCB	PI dl-PCB # 77, 126, 169 Conc.: 10 pg/μL	PR PCDD/PCDF (EN1948) 1,2,3,4-TCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD Conc.: 2 pg/μL	dl-PCB #77, 126, 169, 81, 105, 114, 118, 123, 156, 157, 167, 189 Conc 1-10 pg/μL
Bajas concentraciones de PCDD/PCDF	PI PCDD/PCDF (EN1948) 2,3,7,8-TCDD 1,2,3,7,8-PnCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD OCDD 2,3,7,8-TCDF 2,3,4,7,8-PnCDF 1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF OCDF Conc.: 2-4 pg/ μl	PR PCDD/PCDF (EN1948) 1,2,3,4-TCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD Conc. 2 pg/μL	EPA-8290STN 2,3,7,8-TCDD 1,2,3,7,8-PnCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD OCDD 2,3,7,8-TCDF 1,2,3,7,8-PnCDF 2,3,4,7,8-PnCDF 1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 1,2,3,7,8,9-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF OCDF Conc.: 2.5-12.5 pg/μl
Altas concentraciones de PCDD/PCDF	PI PCDD/PCDF (EN1948) 2,3,7,8-TCDD 1,2,3,7,8-PnCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD OCDD 2,3,7,8-TCDF 2,3,4,7,8-PnCDF 1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF OCDF Conc.: 20-40 pg/ μL	PR PCDD/PCDF (EN1948) 1,2,3,4-TCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD Conc. 20 pg/μL	EPA-8290STN 2,3,7,8-TCDD 1,2,3,7,8-PnCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD 1,2,3,6,7,8-HxCDD 1,2,3,7,8,9-HxCDD 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD OCDD 2,3,7,8-TCDF 1,2,3,7,8-PnCDF 2,3,4,7,8-PnCDF 1,2,3,4,7,8-HxCDF 1,2,3,6,7,8-HxCDF 1,2,3,7,8,9-HxCDF 2,3,4,6,7,8-HxCDF 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF OCDF Conc.: 25-125 pg/μL

8.3 Fabricante de patrones

PC de PCDD/PCDF: EPA-8290STN, Wellington Laboratories, Ontario, Canadá

PI de PCDD/S: EN-1948ES, Wellington Laboratories, Ontario, Canadá

PR de PCDD/PCDF: Patrón interno EPA-1613

dl-PCB: Wellington Laboratories, Ontario, Canadá

PI de dl-PCB: MBP-CP, Wellington Laboratories, Ontario, Canadá

También se encuentran disponibles patrones equivalentes de Cambridge Isotopes Laboratories, Anover, MA, EE.UU.

8.4 Extracción

Elegir los métodos de extracción pertinentes según la matriz.

8.4.1 Extracción de fase sólida -columnaabierta – adecuado para, por ejemplo, el tejido adiposo

Para muestras de bajo nivel, por ejemplo, grasa de ballena calderón:

Preparar una columna de 50 ml aplicando un pequeño tapón de fibra de vidrio en el fondo. Transferir alrededor de 25-30 g de la muestra homogenizada a la columna. Eluir la grasa con 4 volúmenes de hexano/diclorometano (1:1) en el matraz de fondo pesado previamente (pesar el matraz antes de lavar). Dejar que el disolvente se evapore (utilizando el evaporador rotatorio y nitrógeno) y pesar el matraz de fondo (redondo) hasta un peso constante.

8.4.2 Extracción Soxhlet – adecuado, por ejemplo, para hollín del aire, sedimento

Cargar la corrida previa al lavado:

Lavar el matraz de fondo (redondo) y partes de Soxhlet con etanol, n-hexano y diclorometano, en ese orden. Llenar el matraz de fondo (redondo) con tolueno, poner el dedal en el extractor Soxhlet e instalar el matraz de fondo (redondo) y el extractor. Cubrir el matraz de fondo (redondo) con papel de aluminio. Encender el agua refrigerante y el calentador Soxhlet, y dejar el sistema encendido durante 24 horas.

Apagar la corrida antes del lavado

Apagar el calentador, pero dejar correr el agua refrigerante. Dejar enfriar el material de vidrio y tolueno antes de vaciar el tolueno (en matraz de fondo y extractor) en la basura.

Cargar la corrida de muestra:

Utilizar un nuevo matraz de fondo redondo, pero utilizando el dedal prelavado. Cargar la muestra en el dedal y adicionar con PI, y agregar tolueno fresco al matraz de fondo (redondo). Para el análisis del aire, cargar el dedal con adsorbente XAD-2 junto con el filtro de partículas. Instalar el matraz de fondo (redondo) y el extractor; cubrir con papel de aluminio. Encender el agua refrigerante y el calentador Soxhlet.

Apagar la corrida de muestra:

Apagar la calefacción, dejar correr el agua refrigerante y dejar enfriar el material de vidrio y tolueno. Verter el tolueno del extractor en el matraz con fondo redondo, y evaporar el tolueno.

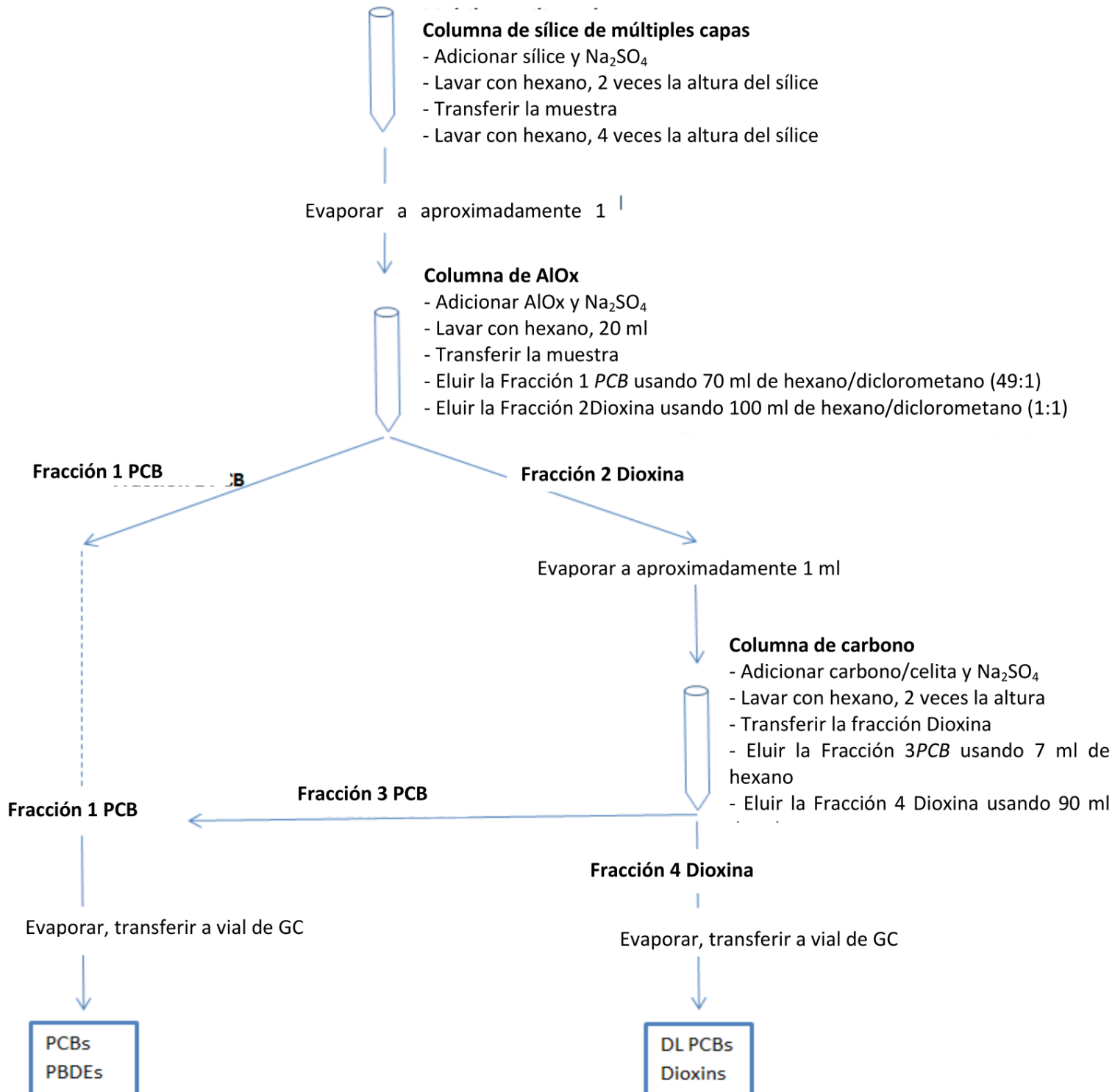
8.4.3 Extracción líquido-líquido – adecuado, por ejemplo, para leche

Preparar una mezcla de 50 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ en etanol, en solución saturada.

Preparar 675 ml de dietil éter/*n*-hexano 7/10 (472.5 ml de dietil éter y 202.5 ml de *n*-hexano).

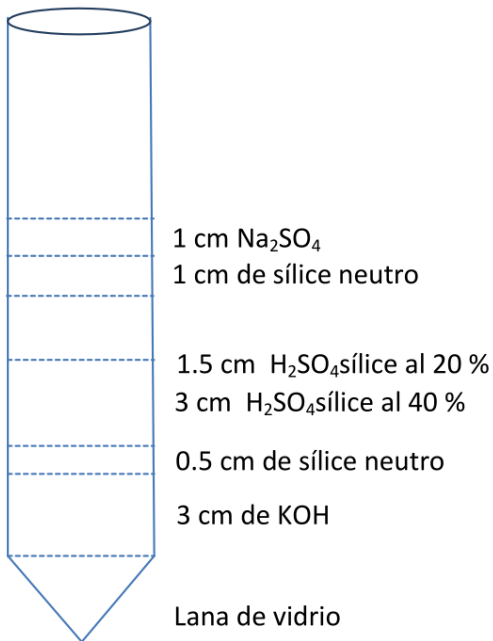
- Verter 150 ml de leche en el embudo separador, y agregar 50 ml de $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$ en etanol y mezclar.
- Adicionar PI en leche o en grasa después de la extracción.
- Agregar 225 ml de dietil/éter/hexano, mezclar y dejar reposar durante 30 minutos.
- Drenar la fase acuosa al vaso de precipitación y la fase orgánica al matraz con fondo pesado previamente.
- Verter la fase acuosa en un embudo de separación, agregar 225 ml de dietil/éter/hexano, mezclar y dejar reposar durante 30 minutos.
- Drenar la fase acuosa en el vaso de precipitación y la fase orgánica en un matraz de fondo previamente pesado (igual que antes).
- Verter la fase acuosa en el embudo de separación, agregar 225 ml de dietil/éter/hexano, mezclar y dejar reposar durante 30 minutos.
- Drenar la fase acuosa al vaso de precipitación.
- Drenar la fase orgánica a un matraz de fondo previamente pesado (igual que antes)
- Evaporar hasta que se seque utilizando el evaporador rotatorio seguido de nitrógeno
- Llegar a un peso constante de la grasa.
- Disolver la grasa en 1-2 ml de hexano, y transferir al sílice de múltiples capas.

8.5 Limpieza

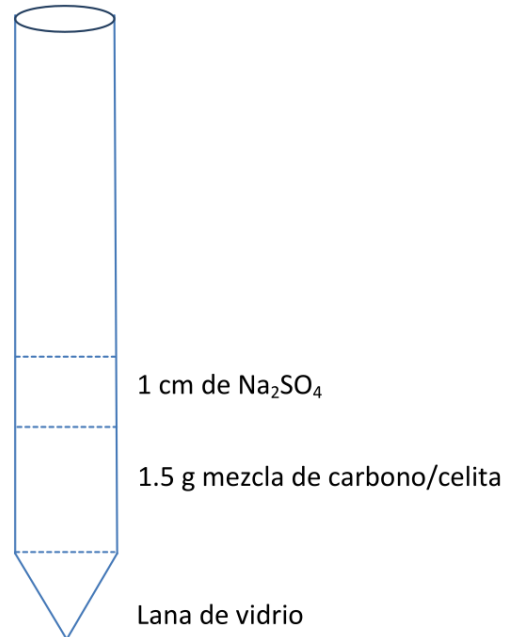
8.5.1 Esquema de la limpieza

8.5.2 Reseña general esquemática de las columnas abiertas

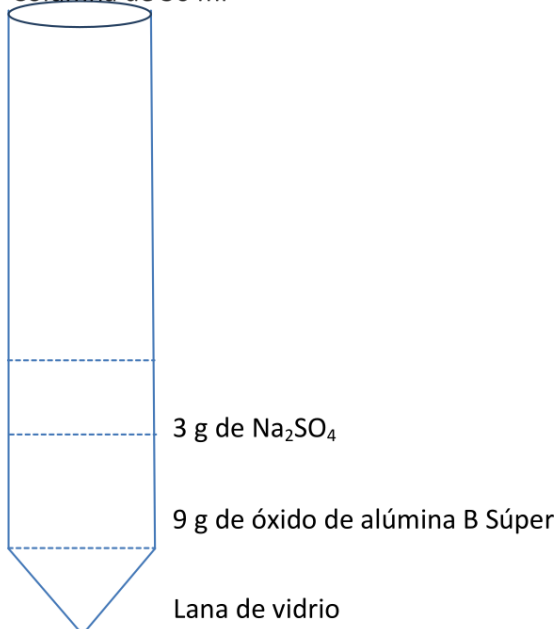
Sílice en múltiples capas
Columna de 50 ml o 100 ml



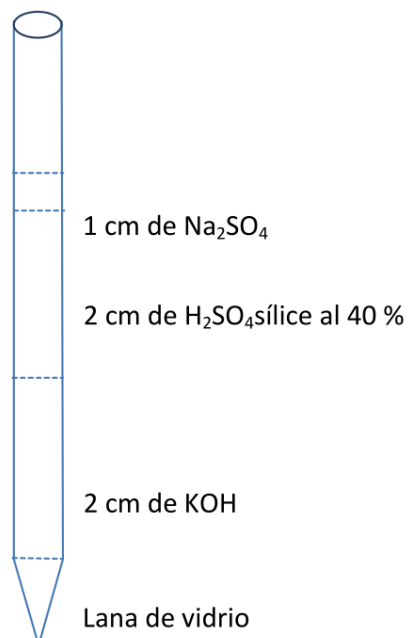
Columna de carbono
Columna de 25 ml



Columna de AlOx
Columna de 50 ml



Mini Pipeta Pasteur sílice



8.5.3 Columna de sílice de múltiples capas ácido/base - Sílice de múltiples capas

El tipo de muestras determina qué columnas utilizar, 50 ml o 100 ml. Si la muestra contiene más de 1 gramo de grasa o si se cree que consume una gran cantidad de sílice dependiendo de su composición, se utiliza una columna de 100 ml. De no ser así se utiliza la columna de 50 ml.

Elución de homogenatos

Se utiliza una columna de vidrio, cuyo tamaño se determina según el tamaño de la muestra. Se agrega una pequeña cantidad de lana de vidrio y se coloca en el fondo de la columna que luego se lava con etanol, *n*-hexano y diclorometano, en ese orden. Luego agregar el homogenato a la columna. Por cada décima muestra que se extrae, se debe extraer una muestra blanco y una de referencia de la misma matriz. En la muestra blanco se sustituye el homogenato con la cantidad correspondiente de sulfato de sodio. Tanto la muestra blanco como las de referencia serán tratadas de la misma manera que las muestras reales. Antes de adicionar/agregar el patrón interno (ver el párrafo que sigue) se debe hacer una elución de las grasas. Esto se hace extrayendo el homogenato con *n*-hexano/diclorometano (1:1), cuatro veces la altura de la columna. Se debe recoger el eluato en los frascos de vidrios previamente pesados. Luego de evaporarse el disolvente y de obtener un peso constante entre las diferentes mediciones, se puede determinar la grasa pesándola.

Las muestras se fortifican con patrones internos (PI) marcados con C¹³.

Para el análisis de PCB, agregar una mezcla de C¹³ PCB-PI y para el análisis de PCDD/PCDF, agregar una mezcla de C¹³PCDD/PCDF –PI. Si se tienen que analizar tanto PCB como PCDD/PCDF, hay que agregar ambos patrones internos a los homogenatos. La concentración y el volumen de los patrones internos que se agregan son determinados por el químico y depende de los niveles esperados en las muestras. El cliente decide de acuerdo con el químico qué congéneres analizar.

Empaque de la columna de múltiples capas

Se utiliza una columna de vidrio cuyo tamaño se determina según el tamaño de la muestra. Se agrega una pequeña cantidad de lana de vidrio a la columna para retener los geles. Se lavan las columnas de vidrio y la lana de vidrio con etanol, *n*-hexano y diclorometano, en el orden mencionado. La columna se llena con 3 cm de gel de sílice - hidróxido de potasio (KOH), 0,5 cm de gel neutro de sílice y 3 cm de gel de sílice - ácido sulfúrico al 40%, 1.5 cm de gel de sílice- ácido sulfúrico al 20%, 1 cm de gel de sílice neutro y 1 cm de sulfato de sodio anhidro. Luego se lava la columna preparada con *n*-hexano con un volumen correspondiente a 2 veces la altura de la columna. Luego se disuelve el puré obtenido a partir de la determinación de la grasa en alrededor de 5 ml de *n*-hexano y se agrega a la columna.

Elución

Los analitos se extraen mediante un volumen de *n*-hexano correspondiente a 4 veces la altura de la columna en un matraz de vidrio.

Evaporación

Luego se evaporan los extractos en un evaporador rotatorio hasta que quede 1 ml del extracto. Si se pretende utilizar el extracto para análisis de PCB, se lo transfiere a viales ámbar de 8 ml y se evapora bajo nitrógeno hasta que queden alrededor de 25 l μ. Luego de la evaporación, se transfieren los extractos a viales de CG que contengan un patrón de recuperación con una mezcla de PCB marcado

con Carbono ¹³. Ver las instrucciones detalladas sobre la adición de muestras y pesado de patrones en el DL MI 1g. Hasta la realización del análisis, los viales se mantienen en un congelador.

8.5.4 Columna de óxido de alúmina (columna - AlOx)

Para limpieza de las fracciones PCB y PCDD/PCDF.

Preparación de las columnas.

Se utiliza Alúmina, AlúminaBSúper 1, ICN como adsorbente en una columna de vidrio de 50 ml.

Primero se coloca una pequeña cantidad de lana de vidrio en el fondo de la columna para retener el adsorbente. Luego se lavan las columnas con etanol, *n*-hexano y diclorometano en el orden mencionado y se las empaqueta con 9g de óxido de aluminio y 3g de sulfato de sodio anhidro encima. Las columnas empaquetadas se lavan luego con 20 ml de *n*-hexano. Se carga el extracto a purificar en la columna. Enjuagar y lavar el recipiente de la muestra con 3 pipetas de *n*-hexano, y cargar la “solución de lavado” en la columna.

Elución

Hacer elución de la fracción PCV planar con 70 ml de *n*-hexano/diclorometano (49:1) en un matraz de vidrio aparte. Agregar 25 µl de tetradecano al matraz que recibe la fracción de PCB planar antes de la elución de los compuestos meta y mantener el matraz con la fracción PCB sellada con un tapón de vidrio.

Se hace una elución de las dioxinas con 100 ml de *n*-hexano/diclorometano (1:1) en un matraz de vidrio aparte.

Evaporación

La fracción de dioxinas se evapora hasta 1 ml utilizando un evaporador rotatorio. Luego se agrega el extracto concentrado a la columna de carbono para seguir limpiando.

8.5.5 Columna de carbono

Para seguir separando la fracción planar y la no planar.

Utilizar columnas de vidrio de 25 ml con un diámetro interno de aproximadamente 14 mm. Se coloca una pequeña cantidad de lana de vidrio en el extremo de la columna para retener la mezcla de carbono. Se enjuaga la columna de vidrio a la que se le agregó la lana de vidrio con etanol *n*-hexano y diclorometano seriadamente. Llenar la columna con una mezcla de 1.5 gramos de carbono celita y agregar aproximadamente 1 cm de sulfato de sodio anhidro encima. La columna de carbono debe prepararse justo antes de utilizar y se la debe enjuagar con *n*-hexano correspondiente a dos veces la altura de la columna de carbono antes de su uso. Ahora puede agregar la muestra (preferentemente en *n*-hexano).

Para eluir el PCB no planar, utilizar 7 ml de *n*-hexano (si se ha utilizado mucho *n*-hexano para aplicar la muestra, utilizar un poco menos de volumen, tratamos de enjuagar el frasco con aproximadamente 3 ml de *n*-hexano y eluir con los 7 ml residuales). Para hacer la elución de PCDD/PCDF; agregar 90 ml de tolueno.

8.5.6 Evaporador rotatorio

Se deben utilizar las siguientes configuraciones para evaporar los disolventes:

Disolvente	Temperatura	Presión
Diclorometano	39 °C	1000 mbar
<i>n</i> -Hexano	45 °C	340 mbar
Tolueno	45 °C	80 mbar

8.5.7 Descripción de método alternativo – Cape Technologies

- Utilizar una columna de sílice por muestra. Retirar los precintos en ambos extremos, y luego colocar la columna en cualquiera de los soportes. Agregar 10 ml de diclorometano a la columna, seguido de 30 ml de hexano, y dejar que comience a gotear por la columna.
- Cuando el hexano chorree hacia fuera de la columna, enjuagar la parte exterior de la punta de la columna con hexano para limpiarla.
- Retirar la columna de carbono y sostenerla con la superficie con el corte derecho hacia arriba y llenar la columna de carbono con hexano. Colocar la columna de carbono sobre la punta de la columna de sílice.
¡NOTA! ¡No se puede permitir que entren burbujas de aire en el sistema!
- Agregar unos pocos ml de hexano a la columna de sílice para estar absolutamente seguro que el sílice queda cubierto con hexano. ¡NOTA! ¡Nunca se puede dejar secar el sílice!
- Presurizar el sistema a alrededor de 0.5 bares-0.7 bares. El hexano fluiría entonces a través del sistema a una velocidad de 0.5-2ml/ min. Aliviar la presión cuando el hexano esté alrededor de 1 cm por encima del sílice.
- Retirar el equipo de despresurización.
- Enjuagar el interior de la columna de sílice con alrededor de 2 ml de hexano. Transferir la muestra a la columna de sílice. Enjuagarnuevamente el interior de la columna de sílice con alrededor de 2 ml de hexano.
- Presurizar el sistema y forzar la muestra y el hexano para que entren en el sílice. Liberar la presión cuando el hexano esté justo por encima de la superficie del sílice. ¡NOTA! ¡Nunca debe secarse!
¡Por residuos!
- Agregar 10 ml de hexano a la columna de sílice. Presurizar el sistema. ¡Nota! ¡El sílice nunca debe secarse! Agregar una porción de 10 ml de hexano a la columna de sílice. Presurizar el sistema. ¡Nota! ¡El sílice nunca debe secarse!
- Agregar 10 ml de hexano a la columna de sílice. Presurizar el sistema. Continuar hasta que el nivel de hexano alcance al sílice neutro, alrededor de 1 cm-2 cm por encima del extremo. ¡NOTA! ¡El hexano debe atravesar el sílice ácido pero la columna de carbono no debe secarse!
Fracción1 (análisis de PCB o residuo)
- Mover la columna de carbono y fijarla con el corte recto hacia arriba en una columna limpia y vacía.
- Agregar 5 ml de hexano y presurizar el sistema. Hasta la fracción PCB 1 o residuo. Agregar 5 ml de hexano:diclorometano (15:85) y presurizar el sistema hasta la fracción PCB 1 o residuo.

- Dejar que el nivel caiga justo por encima de la punta de la columna vacía. ¡NOTA! ¡No debe secarse la columna de carbono!
- Remover la columna de carbono y girar hacia arriba la incisión inclinada; fijarla nuevamente en la columna vacía.
- Agregar 50 ml de tolueno y presurizar el sistema.
Fracción 2(PCDD/PCDF ydl-PCB)

9 ANÁLISIS INSTRUMENTALES

Por favor, observar que el gradiente y las configuraciones de MS dependen del sistema GC-MS y del tipo de columnas utilizadas. Esas configuraciones se deben optimizar para las columnas y los instrumentos internos.

- Instalar la columna analítica;
- Afinarla MS. Si no se logra afinar bien, hay que limpiar la fuente;
- Verificar el sistema realizando una verificación de señal/ruido para cada PCDD/PCDF y DL-PCB, inyectando la solución de calibración con la menor concentración;
- Hacer un método en el software para los análisis de PCDD/PCDF y dl-PCB. En la Tabla4 se presentan las configuraciones para la separación y detección en un HRGC/HRMS;
- Colocar los viales con extractos, blancos, y soluciones de calibración en la bandeja del automuestreador;
- Hacer una secuencia en la computadora; las soluciones de calibración, el blanco, el material de referencia; y las muestras
- Comenzar la secuencia.

Tabla4: Configuración para análisis de PCDD/PCDF y dl-PCB en un HRGC/HRMS

Columna:	Columna capilar, 30 m (d.i. 0.25 mm, 25 μ m) columna DB-5MS (Agilent J&W Scientific; Folsom, CA, EE.UU.).
Volumen de inyección:	1 μ L
Modo de inyección:	Splitless
Gas portador	Helio
Flujo inicial nominal	1.0 ml/min

10 CUANTIFICACIÓN

Cuando se analiza PCDD/PCDF, habitualmente se utilizan técnicas de cromatografía de gases de alta resolución y de espectrometría de masas de alta resolución. Se utilizan esas técnicas porque brindan suficiente selectividad como para distinguir PBDD/PCDF de otros compuestos halogenados. La OMS (1998) resume los criterios propuestos para detección y cuantificación de PCDD/PCDF:

- El tiempo de retención /RI debe ser correcto para ese analito (se necesitan patrones).
- La recuperación del "patrón sustituto" debería estar entre 40% y 120%.
- Todas las relaciones m/z monitoreadas para un analito dado deben maximizarse simultáneamente \pm 1 segundo, con una razón señal/ruido mayor o igual a 2.5 para cada uno. El clúster M^{+*} es relativamente intenso para todos los congéneres. Para confirmación, se deben

monitorear dos iones adicionales (m/z) en la espectrometría de masa – monitoreo selectivo de iones para impacto (EI-SIM-MS).

- La relación entre los dos iones del clúster M^{+*} debe estar dentro del 20% (relativo) del teórico.

Para identificación y cuantificación existen programas de software como MassLynx, Chemstation, Masshunter, etc.

Utilizar el software para identificar los picos meta en los cromatogramas GC/MS basado en el tiempo de retención (TR) y la transición m/z (ver en la

Tabla 5 la configuración para PCDD/PCDF y la detección de dl-PCB y cuantificación después de la separación).

Utilizar las áreas pico de estos picos en las soluciones de calibración para trazar una curva de calibración de cada uno de los compuestos meta. Comparar las áreas de los picos y los tiempos de retención de los picos en la solución de calibración con aquellas de los picos en las muestras y calcular las concentraciones.

Tabla5: Configuración de GC/MS para la separación dePCDD/PCDFydl-PCBen columna Agilent DB-5MS.

Compuesto	Descripción	m/z meta	m/z calificante	Uso del númeroPI	
2,3,7,8-TCDD	Compuesto meta	319.8965	321.894	9	
1,2,3,7,8-PnCDD	Compuesto meta	355.8546	353.8576	10	
1,2,3,4,7,8-HxCDD	Compuesto meta	389.816	391.813	11	
1,2,3,6,7,8-HxCDD	Compuesto meta	389.816	391.813	11	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	Compuesto meta	389.816	391.813	12	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	Compuesto meta	423.777	425.774	13	
OCDD	Compuesto meta	457.738	459.735	1	
2,3,7,8-TCDF	Compuesto meta	303.9016	305.899	2	
1,2,3,7,8-PnCDF	Compuesto meta	339.860	341.857	2	
2,3,4,7,8-PnCDF	Compuesto meta	339.860	341.857	3	
1,2,3,4,7,8-HxCDF	Compuesto meta	373.821	375.818	4	
1,2,3,6,7,8-HxCDF	Compuesto meta	373.821	375.818	5	
2,3,4,6,7,8-HxCDF	Compuesto meta	373.821	375.818	5	
1,2,3,7,8,9-HxCDF	Compuesto meta	373.821	375.818	6	
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	Compuesto meta	407.782	409.779	6	
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	Compuesto meta	407.782	409.779	7	
OCDF	Compuesto meta	441.743	443.740	7	
Compuesto	Descripción	m/z meta	m/z calificante	Número PI	Uso del númeroPR
2,3,7,8-TCDD	PI	333.9339	331.9368	8	RS1
1,2,3,7,8-PnCDD	PI	367.895	369.8919	9	RS1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	PI	401.856	403.853	10	RS2
1,2,3,6,7,8-HxCDD	PI	401.856	403.853	11	RS2
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	PI	435.817	437.814	12	RS2
OCDD	PI	469.778	471.775	13	RS2
2,3,7,8-TCDF	PI	317.9389	333.9339	1	RS1
2,3,4,7,8-PeCDF	PI	351.900	353.8970	2	RS1
1,2,3,4,7,8-HxCDF	PI	385.8610	383.8639	3	RS2
1,2,3,6,7,8-HxCDF	PI	385.8610	383.8639	4	RS2
2,3,4,6,7,8-HxCDF	PI	385.8610	383.8639	5	RS2
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	PI	419.8220	417.8250	6	RS2
OCDF	PI	455.7801	453.7830	7	RS2
Compuesto	Descripción	m/z meta	m/z calificante	Número de PR	
1,2,3,4-TCDD	PR	333.9339	331.9368	RS1	
1,2,3,7,8,9-HxCDD	PR	401.856	403.853	RS2	

Compuesto	Descripción	m/z meta	m/z calificante
PCB 81	Compuesto meta	291.9194	289.9224
PCB 77	Compuesto meta	291.9194	289.9224
PCB 105	Compuesto meta	325.8804	327.8775
PCB 114	Compuesto meta	325.8804	327.8775
PCB 118	Compuesto meta	325.8804	327.8775
PCB 123	Compuesto meta	325.8804	327.8775
PCB 126	Compuesto meta	325.8804	327.8775
PCB 156	Compuesto meta	359.8415	361.8385
PCB 157	Compuesto meta	359.8415	361.8385
PCB 167	Compuesto meta	359.8415	361.8385
PCB 169	Compuesto meta	359.8415	361.8385
PCB 189	Compuesto meta	393.8025	395.7995
PCB 77	PI	303.9597	301.9626
PCB 126	PI	337.9207	339.9178
PCB 169	PI	371.8817	373.8788
1,2,3,4-TCDD	PR	333.9339	331.9368
1,2,3,7,8,9-HxCDD	PR	401.856	403.853

11 AC/CC

A los efectos del control de calidad, incluir un blanco, una muestra duplicada y un material de referencia interna en cada serie de 12 muestras como máximo. Se hace hincapié en la recomendación de participar en estudios interlaboratorio (EIL) y análisis de materiales de referencia certificados (MRC) regularmente para garantizar la calidad de los análisis.

12 REFERENCIAS

UNEP (2013): Guidance on the global monitoring plan for persistent organic pollutants. UNEP/POPS/COP.6/INF/31, 4 February, accessible from www.pops.int

EPA 1613 accessible from <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/organics/dioxins/index.cfm>

EPA 1668 accessible

from http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2009_01_07_methods_method_1668.pdf,

EN 1948 accessible from https://www.jstage.jst.go.jp/article/analscisp/17icas/0/17icas_0_i551/_pdf

Cape Technologies method <http://www.dioxin20xx.org/pdfs/2010/10-1694.pdf>