

## **1. EXPERIMENTAL PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE LOS PESTICIDAS LIMITADOS POR LA ECO-LABEL**

### **1.1 PATRONES DE PESTICIDAS**

#### **1.1.1 PATRONES PUROS**

El presente trabajo se ha realizado empleando patrones puros certificados de los pesticidas limitados por la Ecoetiqueta europea. Dichos patrones han sido obtenidos por el Laboratorio de Control de la Contaminación del INTEXTER a través de dos fuentes:

Cedidos generosamente por la *US Environmental Protection Agency. Pesticides Repository. C/o ManTech Environmental Technology 2 Triangle Drive. Research Triangle Park, NC 27709.*

Mediante la compra de pesticidas certificados de la casa. Dr. Ehrenstorfer GmbH a la empresa Crom-Lab. S.L. C/ Acer 30-32, Edificio Sertram , PI2 M.3ª- 08030-Barcelona.

En la Tabla 1 se citan los porcentajes de pureza de los pesticidas puros empleados, adjuntándose en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** los certificados de pureza y de importación.

**Tabla 1 Porcentajes de pureza de los patrones de pesticidas puros empleados**

<b>PESTICIDA</b>	<b>% pureza E.P.A</b>	<b>% pureza Dr. Erhenstorfer GmbH</b>
<i>Hexaclorobenceno</i>	99,7	
<i>Captafol</i>		99,4
<i>o,p´-DDE</i>		99,3
<i>p,p´-DDE</i>		99,7
<i>o,p´-DDD</i>	99,2	99,7
<i>p,p´-DDD</i>	99,8	98,7
<i>o,p´-DDT</i>		99,8
<i>p,p´-DDT</i>	99,7	99,7
<i>Clordano</i>	100	
<i>Heptacloro</i>	99,9	
<i>Aldrin</i>	99,0	
<i>Dieldrin</i>	98,8	98,1
<i>Endrin</i>	96,6	98,4
<i>2,4,5-T</i>	97,5	98,4
<i>Pentaclorofenol</i>	99,5	98,6
<i>Canfecloro</i>	100	

### 1.1.2 DISOLUCIONES PESTICIDAS ORGANOCOLORADOS

Además de los patrones de pesticidas puros citados previamente, en el desarrollo del presente trabajo experimental se emplearon soluciones de concentraciones certificadas de los siguientes pesticidas organoclorados:

Solución POC's concentrado en n-Hexano (Ver Tabla 2)

Solución POC's diluida en isooctano (Ver Tabla 2)

**Tabla 2 Solución POC's concentrada en n-hexano y diluida en isooctano**

<b>PESTICIDA</b>	<b>POC's concentrada (ng/<math>\mu</math>l)</b>	<b>POC's diluida (ng/<math>\mu</math>l)</b>
<i>alpha-HCH</i>	10	0,105
<i>beta-HCH</i>	10	0,102
<i>gamma-HCH</i>	10	0,106
<i>delta-HCH</i>	10	0,100
<i>epsilon-HCH</i>	-	0,100
<i>Heptacloro</i>	10	0,206
<i>Aldrin</i>	10	0,200
<i>Heptacloro epoxido</i>	10	0,208
<i>o,p'-DDE</i>	10	0,204
<i>Endosulfan I</i>	10	0,198
<i>Dieldrin</i>	10	0,203
<i>p,p'-DDE</i>	10	0,202
<i>o,p'-DDD</i>	10	0,399
<i>Endrin</i>	10	0,199
<i>Endosulfan II</i>	10	0,200
<i>p,p'-DDD</i>	10	0,408
<i>o,p'-DDT</i>	10	0,404
<i>Endrin Aldehido</i>	10	0,400
<i>Endosulfan Sulfate</i>	10	0,404
<i>p,p'-DDT</i>	10	0,407

\* Se indican sombreados aquellos pesticidas limitados por la Ecoetiqueta europea presentes en las soluciones POC's

### 1.1.3 DISOLUCION PATRON INTERNO ESTÁNDAR

La solución empleada como patrón interno estándar en la GC-MS, con concentración así mismo certificada es la que se relaciona en la Tabla 3. Como se puede observar los analitos organoclorados empleados como estándar interno son deuterados para una mejor detección mediante la cromatografía de gases-espectrometría de masas.

**Tabla 3 Solución patrón interno estándar**

<b>Componente</b>	<b>%</b>
<i>Acenafteno-d<sub>10</sub></i>	0,4
<i>Criseno-d<sub>12</sub></i>	0,4
<i>1,4-Diclorobenceno-d<sub>4</sub></i>	0,4
<i>Naftaleno-d<sub>8</sub></i>	0,4
<i>Perileno-d<sub>12</sub></i>	0,4
<i>Fenantreno-d<sub>10</sub></i>	0,4
<i>Cloruro de metileno</i>	97,6

### 1.1.4 MEDIDAS DE PROTECCIÓN

La exposición a todos los reactivos citados debe minimizarse dada su condición de analitos altamente tóxicos i/o cancerígenos para los mamíferos (Ver Tabla 4), para ello se han empleado guantes de latex, ropa de protección, y en algunos casos gafas protectoras. En la medida de lo posible la manipulación de estos analitos se ha realizado bajo campana extractora.

**Tabla 4 Características toxicológicas patrones puros de pesticidas OC**

<b>PESTICIDA</b>	<b>CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS</b>	<b>LD<sub>50</sub> dosis aguda oral en ratas (mg/kg)</b>
<i>Hexaclorobenceno</i>	Cancerígeno-Tóxico	10
<i>Captafol</i>	Cancerígeno-Tóxico	6200
<i>o,p'-DDE</i>	Dañino	-
<i>p,p'-DDE</i>	Dañino	-
<i>o,p'-DDD</i>	Tóxico	-
<i>p,p'-DDD</i>	Sospechoso de cancerígeno-Tóxico	113
<i>o,p'-DDT</i>	Sospechoso de cancerígeno	-
<i>p,p'-DDT</i>	Cancerígeno-Tóxico	250-300
<i>Clordano</i>	Cancerígeno-Tóxico	40
<i>Heptacloro</i>	Cancerígeno-Tóxico	40
<i>Aldrin</i>	Sospechoso cancerígeno-Tóxico	67
<i>Dieldrín</i>	Sospechoso cancerígeno-Tóxico	40-87
<i>Endrín</i>	Tóxico	5-45
<i>2,4,5-T</i>	Dañino	500
<i>Pentaclorofenol</i>	Sospechoso cancerígeno-Tóxico-Irritante	2103
<i>Canfecloro</i>	Cancerígeno	50

---

## 1.2 ALGODÓN CRUDO

La fibra cruda de algodón empleada en el presente proyecto se ha obtenido a través de la empresa importadora *Artigas Cotton Agents*, con sede en Barcelona, la cual ha procedido al envío de muestras de aproximadamente 1 kg de algodón crudo procedente de los siguientes países productores:

Grecia

Méjico

Argentina

Australia

Israel

Turquía

ex - URRS (C.E.I)

Se adjuntan certificados fitosanitarios del algodón importado (Ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)

Se adjunta el certificado de la Direcció General de Qualitat Ambiental. Generalitat de Catalunya. Departament de Mediambient. Conforme el Laboratorio de Control de la Contaminación del INTEXTER, está autorizado a realizar las pruebas necesarias para la obtención de la Ecoetiqueta europea para ropa de cama y camisetas de algodón o mezclas algodón-poliéster en base a la directiva inicial establecida en 1996. (Ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En la actualidad dicha directiva ha sido modificada (1999) como ya se ha mencionado repetidamente en el presente trabajo, por un nuevo documento genérico para artículos textiles.

### 1.3 TÉCNICAS

#### 1.3.1 INTRODUCCIÓN.

El 1 de marzo de 1996 la Comisión Europea procede a aprobar el Doc. XI/395/95-Rev. 3 Orig <sup>(2)</sup> el que se establecen los criterios ecológicos para la concesión de la etiqueta ecológica a camisetas y ropa de cama (sábanas, fundas de almohadas, edredones, colchas, cenefas...) confeccionados 100% de algodón o mezclas algodón-poliéster.

Desde este momento se hace patente la necesidad de desarrollar el presente proyecto en el INTEXTER, al ser el organismo acreditado por el Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya para realizar los análisis y test pertinentes de cara a la concesión o no de dicha ecoetiqueta (Ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

La última revisión de la Etiqueta ecológica para artículos textiles corresponde al documento: Decisión de la Comisión de 17 de febrero de 1999 por la que se establecen los criterios ecológicos para la concesión de la etiqueta ecológica comunitaria a los productos textiles. *DOL 5-3-1999. L57/21 –57/31.*

Uno de los criterios ecológicos especificados en la Directiva mencionada (1999), corresponde al contenido en pesticidas del hilo de algodón crudo, estableciéndose un límite de 0.05 mg/kg hilo para los pesticidas:

*Aldrín, Captafol, Clordano, DDT, Dieldrín, Endrín, Heptaclo, Hexaclorobenceno, Hexaclorociclohexano, 2,4,5-T, Clorodimeformo, Clorobenzilato, Dinoseb ( y sales) y Monocrotofós.*

El procedimiento general de análisis de pesticidas organoclorados se puede resumir en tres fases:

una primera fase de preparación de muestra y extracción que permite aislar los analitos de interés.

una segunda fase de purificación

finalmente el análisis instrumental que permita la identificación, confirmación y cuantificación de los residuos y que en general se realiza mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones GC-ECD o cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas GC-MS.

Las fases de extracción y purificación de la muestra se consideran críticas, <sup>(i-ii)</sup> ya que se deben recuperar cuantitativamente los analitos de interés para su posterior análisis. <sup>(iii)</sup>

**Fig. 1 Fases del proceso de análisis de pesticidas**





---

### 1.3.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LA MUESTRA <sup>(iv)</sup>

#### 1.3.2.1 **Material**

Balanza analítica calibrada Mettler H54AR de 160 g de capacidad y una precisión de  $\pm 0,0001$  g

Granatario Sartorius 1216 MP de 120 g de capacidad y una precisión de  $\pm 0,01$  g

Estufa de laboratorio Selecta.

Desecador

#### 1.3.2.2 **Técnica Experimental**

Se deben pesar exactamente tres muestras de aproximadamente 5 g, con una precisión de  $\pm 0,01$ g como mínimo, dado que los porcentajes de humedad del algodón no son excesivamente elevados se recomienda una precisión de  $\pm 0,0001$  g.

Las muestras pesadas para el cálculo del porcentaje de humedad se deben mantener durante una noche a 105 °C en la estufa de laboratorio y posteriormente dejar enfriar una hora en el desecador hasta peso constante.

Calcular el porcentaje de humedad según la ecuación

$$\% \text{hd} = \frac{(m_t - m_s)}{m_t} \times 100$$

**Ec. 1**      **Porcentaje de humedad**

**(%) hd:** es el porcentaje de humedad de la muestra

**$m_s$ :** masa seca

**$m_t$ :** masa total de muestra

Las concentraciones de los diferentes analitos a analizar deben referirse a muestra seca.

### 1.3.3 EXTRACCIÓN SOXHLET AUTOMATIZADA

La extracción de los pesticidas de la fibra de algodón cruda se ha realizado mediante una Extracción Soxhlet Automatizada. <sup>(v-vii-viii)</sup> Los resultados obtenidos son totalmente comparables a una Extracción Soxhlet <sup>(ix)</sup>

#### 1.3.3.1 Reactivos

Diclorometano (residuo pesticida o equivalente), (DCM)CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Merck  
n-Hexano (residuo pesticida o equivalente), C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

#### 1.3.3.2 Material

Extractor Soxhlet automatizado SOXTEC<sup>®</sup> System HT2 , con baño de aceite y controlador de temperatura.

Cartuchos extracción celulosa 33 x 80 Macherey-Nagel. Ref. MN645

Vasos extracción de aluminio Tecator. Ref. 1000-2290

Adaptadores de cartuchos de celulosa de Ø 33 mm. Ref. 1622-0030

Juntas de Vitón. Ref 1000-2705 (Resistentes al Diclorometano)

Balanza analítica calibrada Mettler H54AR de 160 g de capacidad y una precisión de ± 0,0001 g

Granatario Sartorius 1216 MP de 120 g de capacidad y una precisión de ± 0,01 g

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Pipetas Pasteur.

Espátula

#### 1.3.3.3 Técnica Experimental

Se procede inicialmente tal y como indica la EPA 3541 <sup>(v)</sup>. En primer lugar las muestras de algodón crudo al ser fibrosas se deben cortar y deshilar para favorecer la posterior extracción de los pesticidas a analizar.

---

Paralelamente al procedimiento 1.3.2 se realiza la extracción Soxhlet, para ello se procede a:

Comprobar el nivel de aceite en el baño y añadir en caso de ser necesario.

Situar el termostato a 105°C siempre que el solvente empleado sea diclorometano.

Abrir el circuito de agua refrigerante, el cual debe ajustarse a unos 2 l/min para prevenir la pérdida de DCM en los condensadores.

Situar aproximadamente unos 100 ml de DCM en el vasito de aluminio.

Una vez realizado el protocolo previo se introduce la muestra de algodón en el dedal de celulosa y pasar a ensamblar el dedal de celulosa al adaptador, situar el vasito de aluminio en el SOXTEC® y sumergir el dedal en el solvente.

Situar los dedales en posición "boiling" durante 60 minutos, es decir sumergidos en el solvente, y proceder a extraer durante este tiempo manteniendo las válvulas del condensador en la posición de "OPEN", de forma que el solvente evaporado sea refrigerado y pase de nuevo al vasito de aluminio.

Una vez transcurrida la hora, situar los dedales en posición de "rinsing", es decir suspendidos sobre la superficie del solvente durante 60 min manteniendo las válvulas del condensador abiertas.

Pasado el nuevo período de tiempo cerrar las válvulas de los condensadores 1/2 de vuelta para ir colectando el solvente. Cuando resten entre 2 y 5 ml de DCM en los vasitos cerrar completamente las válvulas y sacar los vasitos de aluminio del SOXTEC®. (*NUNCA DEJAR EVAPORAR TOTALMENTE*). Cerrar el circuito de agua refrigerante y apagar el sistema si no se realizan seguidamente más extracciones.

Se debe transferir cuantitativamente el extracto a un vial de 12 ml de fondo plano, añadir diclorometano 3 veces al vasito de aluminio para arrastrar posibles residuos de pesticida y transferir de nuevo al vial.

---

Finalmente se debe proceder a un intercambio de solvente del extracto graso pasando del DCM al n-hexano, para ello se sitúan los viales bajo una corriente de N<sub>2</sub> de forma que se evapore el DCM hasta que quede una mínima cantidad (*NUNCA DEJAR EVAPORAR TOTALMENTE*), añadir 1-2 ml de n-hexano y dejar evaporar 1-2 min más los restos de DCM.

Proceder al intercambio cuantitativo de vial, pasando con una pipeta Pasteur la muestra desde el vial de 12 ml al de 4 ml. Añadir 3 veces n-hexano al vial de 12 ml para asegurarnos de la recuperación completa. Enrasar el vial de 4 ml hasta el volumen final deseado (4 ml en principio) y almacenar a 4 °C si no se procede a la purificación inmediatamente.

#### **1.3.3.3.1 Adición de muestreador del proceso**

Cada cierto número de muestras de algodón (unas 15) es conveniente realizar una adición de una disolución que contenga los pesticidas que se pretende detectar, la llamada matrix spike., a dos muestras por separado de algodón.

Estas dos muestras de algodón servirán de muestreadores de los procesos de extracción, concentración y purificación ya que serán analizadas dentro del protocolo de inyección de muestras en el GC-MS tras los estándares de calibración y los blancos de solvente.

Para la preparación de dicha disolución se empleará el estándar stock mezcla diluido tantas veces como sea necesario en función del volumen añadido, considerando que el volumen final tras la concentración y purificación es de 1 ml.

#### 1.3.4 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CERAS

En algunos casos puede ser interesante o necesario conocer el contenido en ceras graso del algodón a analizar, SÓLO en estos casos es necesario proceder como sigue.

##### 1.3.4.1 Reactivos

- Diclorometano (residuo pesticida o equivalente), (DCM)CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Merck

##### 1.3.4.2 Material

- Extractor Soxhlet automatizado SOXTEC<sup>®</sup> System HT2 , con baño de aceite y controlador de temperatura.
- Cartuchos extracción celulosa 33 x 80 Macherey-Nagel. Ref. MN645
- Vasos extracción de aluminio Tecator. Ref. 1000-2290
- Adaptadores de cartuchos de celulosa de Ø 33 mm. Ref. 1622-0030
- Juntas de Vitón. Ref 1000-2705 (Resistentes al Diclorometano)
- Balanza analítica calibrada Mettler H54AR de 160 g de capacidad y una precisión de ± 0,0001 g
- Espátula

##### 1.3.4.3 Técnica Experimental

Situar los vasitos de aluminio que contendrán el extracto graso en el desecador durante 1 h hasta peso constante. Tararlos en una balanza analítica con una precisión de ± 0,0001 g.

Proceder tal y como se refiere en la **Sección 1.3.3.3** hasta el punto en que se recoge entre 2-5 ml de solvente tras las 2 h de extracción. En este caso evaporar por completo el DCM, devolver los vasitos de aluminio con el extracto y situar en el desecador para dejar enfriar durante 1 h hasta peso constante.

---

Para el cálculo del porcentaje de ceras de la muestra proceder según la ecuación:

$$\% c = \frac{m_f - m_i}{m_t} \times 100$$

**Ec. 2**      **% ceras de la muestra**

**%c:** porcentaje ceras de la muestra

**m<sub>f</sub>:** masa final del vaso de aluminio más el extracto graso

**m<sub>i</sub>:** tara del vaso de aluminio

**m<sub>t</sub>:** masa total de muestra

Estos extractos no pueden emplearse en las fases de purificación y análisis para la determinación de pesticidas dado que el solvente empleado para la extracción se ha evaporado completamente.

### 1.3.5 CONCENTRACIÓN POR NITRÓGENO <sup>(x)</sup>

Técnica a emplear para la reducción de volúmenes o intercambio de solventes si el volumen de muestra inicial no supera los 15 ml.

#### 1.3.5.1 Reactivos

N<sub>2</sub> gas calidad N-50 como mínimo

- Diclorometano (residuo pesticida o equivalente), (DCM)CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Merck

n- Hexano (residuo pesticida o equivalente) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

#### 1.3.5.2 Material

Viales de 4 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7138

Viales de 1 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Chromacol Ref.100 x 8-6RTI

Concentrador de N<sub>2</sub> Six-Port Mini- Vap CRS. Ref. 201006

#### 1.3.5.3 Técnica Experimental

Si es posible situar los viales en un baño de agua templada (entre 30 °C –35 °C) manteniendo el nivel del solvente por debajo del agua. De no disponer de un baño de agua operar a T ambiente.

Limpiar las líneas de gas de acero inoxidable del evaporador con n-hexano o acetona, sumergiendo dichas líneas en un vial con el solvente limpiador. Lavar también las paredes externas varias veces y secar antes de su uso.

Burbujear suavemente N<sub>2</sub> sobre los viales a concentrar. NO PERMITIR EN NINGUN CASO QUE SE EVAPORE TOTALMENTE. Para proceder a intercambiar el DCM por n-hexano dejar concentrar el vial con la muestra inicial hasta 1-2 ml, añadir 1-2 ml de n-hexano y dejar evaporar nuevamente, dada la mayor volatilidad del DCM



---

respecto el n-hexano aseguramos su total eliminación. Finalmente enrasar con n-hexano al V final deseado.

### 1.3.6 CONCENTRACIÓN MEDIANTE KUDERNA-DANISH (K-D) <sup>(xi)</sup>

Técnica a emplear para la reducción de volúmenes o intercambio de solventes si el volumen de muestra es superior a 150 ml

#### 1.3.6.1 Reactivos

- Diclorometano (residuo pesticida o equivalente), (DCM)CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Merck
- n- Hexano (residuo pesticida o equivalente) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

#### 1.3.6.2 Material

Sistema Kuderna-Danish:

Kuderna-Danish (K-D) de 250 ml. Ref. Q-2198. Scharlau.

Columna Snyder. Ref. Q-2196. Scharlau.

Colectores graduados de 10 ml Ref. Q-2197. Scharlau.

Baño de agua

Campana extractora

Boiling chips de teflón

#### 1.3.6.3 Técnica Experimental

Para cada muestra a concentrar tras los procesos de purificación (GPC, Florisil éter etílico-éter petróleo) se debe proceder tal y como sigue.

Añadir una o dos boiling chips al K-D y enroscarle la columna Snyder y el tubo colector. Humedecer la columna Snyder añadiendo 1ml de Diclorometano.

---

Situar el sistema K-D en un baño de agua bajo una campana extractora, de forma que el colector quede sumergido parcialmente en el agua caliente (80 °C) y la superficie redonda del K-D quede bañada de vapor.

En el momento de sumergir agitar un poco para ayudar a que las burbujas de ebullición lleguen hasta la superficie y evitar así “explosiones” de solvente. Durante todo el proceso se debe agitar de vez en cuando el sistema para activar los boiling chips.

Para comprobar la adecuada velocidad de evaporación del solvente se debe comprobar como las piezas de la columna Snyder vibran continuamente pero no flotan sobre solvente condensado.

Una vez en el tubo colector se llega a unos 4 ml de solvente, el sistema K-D se retira del baño y se deja enfriar a T ambiente de forma que así condense el resto de solvente. Una vez frío añadir 1-2 ml de diclorometano al sistema.

Para desconectar el tubo colector y la columna Snyder, secar las juntas con celulosa para evitar que el vapor-agua del baño contamine la muestra.

Se procede a concentrar la muestra bajo corriente de N<sub>2</sub> tal y como se describe en la sección **1.3.5**.

---

### 1.3.7 METODOS DE PURIFICACIÓN. INTRODUCCIÓN

Hay diferentes métodos de purificación que se han empleado en el presente trabajo de investigación, ya que en base a la bibliografía u otras fuentes de información consultadas son los considerados óptimos para la purificación de extractos grasos de pesticidas. Dichos métodos de purificación son:

Florisil 1 (Éter etílico-éter de petróleo)

Florisil 2 (Hexano-acetona) o Florisil Small Columns

Gel Permeation Clean-Up o GPC

Silica

Alumina

Uno de los objetivos del presente trabajo es el desarrollo de un protocolo de trabajo que permitiera el análisis de los pesticidas limitados por la Ecoetiqueta europea, pero por otro lado se ha intentado optimizar en lo que se refiere a:

Tiempo de análisis

Coste de material

Resultados obtenidos

En los presentes apartados se desarrollan los métodos de purificación empleados para comparar su efectividad.

---

### 1.3.8 PURIFICACIÓN FLORISIL 1 (ETER ETÍLICO/ÉTER PETRÓLEO)<sup>(xii-xiii-xiv)</sup>

Las interferencias que se encuentren junto con los pesticidas a analizar en el extracto graso de la fibra de algodón, se eliminan al pasar dicho extracto por una columna de Florisil, al ir incrementando progresivamente la polaridad del solvente empleado para eluir.

#### 1.3.8.1 **Reactivos**

Éter etílico destilado con un 2% de etanol como conservador. (residuo pesticida o equivalente)Merck .

Éter de petróleo destilado

Sulfato de sodio anhidro granular. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (para análisis) Ref. 131716 Panreac

Florisil (residuo pesticida o equivalente) 60-100 mesh Ref. 3369 J.T. Baker

Eluyentes:

6% (v/v) éter etílico-éter petróleo

15% (v/v) éter etílico-éter petróleo

50% (v/v) éter etílico-éter petróleo

Boiling chips porosidad 20-30

#### 1.3.8.2 **Material**

Columna cromatográfica LC 25mm Øext x 22mm Øint x 300mm. Ref. 64760-U  
Supelco.

Kuderna-Danish (K-D) de 250 ml. Ref. Q-2198. Scharlau.

Columna Snyder. Ref. Q-2196. Scharlau.

Colectores graduados de 10 ml Ref. Q-2197. Scharlau.

---

### 1.3.8.3 Técnica Experimental

#### 1.3.8.3.1 Florisil

El Florisil debe estar activado, caso de no estarlo mantener a 650 °C en una mufla durante una noche.<sup>(xiv)</sup>

Desactivación del Florisil: para eliminar los ésteres phtálicos después de haber realizado purificaciones de muestras.

Tomar unos 100 g de Florisil en un erlenmeyer de 500 ml y calentar en una estufa a 40 °C durante 16 horas. Transferir a una recipiente de vidrio y dejar enfriar a temperatura ambiente manteniendo bien cerrado el recipiente. Una vez frío añadir 3 ml de agua bidestilada, agitar vigorosamente durante 10 min y dejar durante 2 h como mínimo.

Reactivación de Florisil: para eliminar nitrosaminas, pesticidas OC, OP y PCB's, compuestos nitroaromáticos, haloéteres, hidrocarburos clorados.

Justo antes de emplear activar el Florisil manteniéndolo al menos 16 h a 130 °C en un recipiente de vidrio cubierto con papel de aluminio. Dejar enfriar en un desecador. De tanto en tanto almacenar el Florisil en el horno a dicha temperatura.

La capacidad de absorción del Florisil puede verse modificada en cada uno de estos procesos.

#### 1.3.8.3.2 Protocolo Experimental

Preparar 200 ml de las siguientes mezclas de éter etílico-éter de petróleo para cada una de las muestras que deben purificarse:

6% (v/v) éter etílico-éter petróleo

15% (v/v) éter etílico-éter petróleo

50% (v/v) éter etílico-éter petróleo

---

Preparar la columna de Florisil:

Añadir unos 12 cm de Florisil en la columna LC 25mm Øext x 22mm Øint x 300mm, golpear suavemente de forma que se asiente y quede en unos 10-11 cm.

Añadir unos 2 cm de sulfato de sodio anhidro.

Humedecer la columna con 40-50 ml de éter de petróleo.

Colocar un K-D con el colector roscado para recoger los eluatos o en su caso un erlenmeyer para posteriormente transferir el eluato a un K-D enjuagando 3 veces con éter de petróleo.

Una vez realizados los pasos previos, se procede a transferir la solución a purificar a la columna a una velocidad de unos 5 ml/min. Enjuagar el recipiente que lo contiene y el sulfato de sodio (si lo hubiere) con 3 porciones de 5 ml de éter de petróleo cada una y transferirlas a la columna. Enjuagar las paredes de la columna con pequeñas porciones de éter de petróleo. Añadir los 200 ml de la solución al 6% a una velocidad de unos 5 ml/min (40 min).

Dejar eluir POR GRAVEDAD. No dejar secar NUNCA la columna entre los diferentes eluatos.

Una vez eluída la primera porción al 6% situar otro K-D y añadir los 200 ml de solución al 15% a 5 ml/min (40 min)

Finalmente situar de nuevo otro K-D y añadir los 200 ml de solución al 50% a 5 ml/min (40 min).

**Tabla 5** Eluato en que se recuperan algunos de los pesticidas limitados por la Ecolabel <sup>(xii)</sup>

<b>Pesticida</b>	<b>Recuperación</b>	<b>Fase % éter etílico- éter petróleo</b>
<b>2,4,5-T</b>	R	15
<b>Aldrin</b>	C (100%)	6
<b>Captafol</b>	P(75-80%)	50
<b>Clordano</b>	C (100%)	6
<b>Clordano-cis</b>	C (100%)	6
<b>Clordano-trans</b>	C (100%)	6
<b>o,p'-DDE</b>	C (98%)	6
<b>p,p'-DDE</b>	C (98%)	6
<b>o,p'-DDD</b>	C (99%)	6
<b>p,p'-DDD</b>	C (99%)	6
<b>o,p'-DDT</b>	C (100%)	6
<b>p,p'-DDT</b>	C (100%)	6
<b>Dieldrín</b>	C (100%)	15
<b>Endrín</b>	C (94-96%)	6-15
<b>Heptacloro</b>	C(100%)	6
<b>Hexaclorobenceno</b>	C (100%)	6
<b>Toxafeno</b>	C (96%)	6
<b>Canfecloro</b>		

Clave de códigos

C: recuperación completa (>80%)

R: recuperado pero sin información cuantitativa disponible

P: recuperación parcial (50-80%) indicado el porcentaje.

### 1.3.9 PURIFICACIÓN FLORISIL 2 <sup>(xv)</sup>

Gracias a este método de purificación se reducen considerablemente las interferencias de carácter polar que se encuentran en el extracto graso junto con los pesticidas.

El mismo volumen de extracto empleado para este método se mantiene tras la purificación (1-2 ml) con lo cual se reducen considerablemente:

el tiempo de operación

el volumen de solvente empleado

el coste global del análisis

se elimina la fase posterior de concentración

#### 1.3.9.1 **Reactivos**

Acetona (residuo pesticida o equivalente) Merck

n- Hexano (residuo pesticida o equivalente) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

Florisil (residuo pesticida o equivalente) 60-100 mesh Ref. 3369 J.T. Baker

Eluyentes:

10%-90% (v/v) acetona-n-hexano

#### 1.3.9.2 **Material (1)**

Columnas de vidrio 6 ml. Ref. 730172. Chromabond ®

Sistema de vacío completo para 12 columnas. Ref. 730151. Chromabond ®

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Teflón

Vasos de precipitados

Embudo

Pipeta aforada 1 ml



Este ha sido el material empleado durante la estancia en el *Southwest Research Institute* (San Antonio Texas EE.UU).

#### **1.3.9.3 Material (2)**

Jeringas de vidrio 5 ml. Ref.Gastigh 1005#. Hamilton

Filtros 13 mm, de 0,45 µm Ref. 6503-06. Lida

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Teflón

Vasos de precipitados

Embudo

Pipeta aforada 1 ml

Este ha sido el material empleado en el Laboratorio de Control de la Contaminación del INTEXTER.

#### **1.3.9.4 Técnica Experimental**

##### **1.3.9.4.1 Florisil**

El Florisil debe estar activado, caso de no estarlo mantener a 650 °C en una mufla durante una noche.<sup>(xiv)</sup>

Desactivación del Florisil: para eliminar los ésteres phtálicos después de haber realizado purificaciones de muestras.

Tomar unos 100 g de Florisil en un erlenmeyer de 500 ml y calentar en una estufa a 40 °C durante 16 horas. Transferir a un recipiente de vidrio y dejar enfriar a temperatura ambiente manteniendo bien cerrado el recipiente. Una vez frío añadir 3 ml de agua bidestilada, agitar vigorosamente durante 10 min y dejar durante 2 h como mínimo.

Reactivación de Florisil: para eliminar nitrosaminas, pesticidas OC, OP y PCB's, compuestos nitroaromáticos, haloéteres, hidrocarburos clorados.

Justo antes de emplear, activar el Florisil manteniéndolo al menos 16 h a 130 °C en un recipiente de vidrio cubierto con papel de aluminio. Dejar enfriar en un desecador. De tanto en tanto almacenar el Florisil en el horno a dicha temperatura.

La capacidad de absorción del Florisil puede verse modificada en cada uno de estos procesos.

#### **1.3.9.4.2 Protocolo Experimental**

Preparar unos 25 ml de acetona-n-hexano 10%-90% (v/v) por muestra a purificar.

En el caso de disponer del material citado en el apartado **1.3.9.2** se procede de la siguiente forma: se debe conectar el sistema de vacío Chromabond ® a una bomba de aspiración o una trompa de vacío, conectando una trampa intermedia. Ajustar la presión de vacío.

Poner un poco de Teflón en las puntas de las jeringas de 6 ml de forma que ajusten bien al sistema de vacío y así facilitemos el proceso de elución.

Tomar Florisil en un vaso de precipitados y verter en un embudo a la columna hasta una altura de 1,5 cm aproximadamente (golpeando suavemente de forma que el Florisil se asiente).

Este sistema se puede sustituir por puntas de pipetas, jeringas, etc. y sin conexión a vacío dejando que las muestras eluyan por gravedad, para ello se emplea el material descrito en la sección **1.3.9.3**, con lo cual se minimiza el coste, aunque si las muestras son muy sucias aumenta el tiempo de operación.

Añadir unos 10 ml de la mezcla acetona-n-hexano para humedecer el Florisil. Dejar eluir POR GRAVEDAD (sea cual sea el material disponible). No dejar secar NUNCA la columna entre los diferentes eluatos. Recoger esta porción de mezcla en un erlenmeyer o vaso de precipitados para residuo.

Enjuagar la punta de las jeringas con n-hexano y cambiar el recipiente colector de residuo por un vial de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE.

Transferir cuantitativamente (jeringa, pipeta aforada) un volumen de muestra a purificar que debe ser IGUAL al volumen final necesario para el análisis (1-2ml)

Eluir los pesticidas del extracto a través de la columna de Florisil, añadiendo porciones de la mezcla acetona- n-hexano hasta recoger unos 9 ml en el vial de 12 ml.

Ajustar a volumen final mediante N<sub>2</sub>.

### 1.3.10 PURIFICACIÓN GEL PERMEATION CLEAN-UP (GPC)<sup>(xvi-xvii)</sup>

Gel Permeation Clean-Up o GPC es un método de purificación por exclusión de tamaño de los diferentes componentes de un extracto, los cuales eluyen a través de una volumen que contiene un gel poroso que se caracteriza por la uniformidad del tamaño de poro.

En el caso de extractos de muestras conteniendo pesticidas organoclorados el solvente empleado es el diclorometano.

#### 1.3.10.1 Reactivos

Diclorometano (residuo pesticida o equivalente).(DCM)CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Merck

Mezcla calibración GPC:

. *Aceite de maiz*, 125 mg

. *Dietileftalato* 5 mg

. *Metoxicloro* 1mg

. *Perileno* 0,1 mg

. *Sulfuro* 0.4 mg

#### 1.3.10.2 Material

Inyector Water 712 Wisp automatizado. Loop 5 ml

Sistema GPC Jordi automatizado

Bio-beds SX3

Detector UV ISCO TYPE 6 OPTICAL UNIT

Jeringas de vidrio 10 ml. Ref.Gastigh 1005#. Hamilton

Filtros 13 mm, de 0,45 µm Ref. 6503-06. Lida

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Teflón

Erlenmeyers 250 ml

Este ha sido el material empleado durante la estancia en el Southwest Research Institute (San Antonio, Texas, EEUU)

### **1.3.10.3 Técnica Experimental**

#### **1.3.10.3.1 Consideraciones generales**

Es muy importante mantener una temperatura constante en el laboratorio durante todo el proceso de purificación, que puede durar 24 h o más si el sistema empleado está automatizado. En el caso de que haya variaciones de temperatura los tiempos de elución pueden modificarse y por tanto las fracciones colectadas correspondientes a residuo o muestra pueden ser incorrectas. La temperatura recomendada es de 22 °C para evitar la evaporación del DCM.

Para evitar la saturación de la columna de GPC, se recomienda la dilución de los extractos muy viscosos.

Dado que las partículas con diámetro superior a 0,5 µm podrían afectar la válvula del inyector, hecho que podría comportar un fallo del sistema o la contaminación de los extractos en el loop de dicho inyector, se recomienda el filtrado de los extractos a través de un filtro de disco de 0,45 µm. Se debe tomar 10 ml del extracto a purificar con la jeringa, conectar el filtro de disco en su punta y forzar el paso del extracto a través de dicho filtro, colectando el extracto ya filtrado en un vial de 12 ml de tapón de rosca y junta de teflón.

#### **1.3.10.3.2 Calibración del sistema GPC**

La calibración del sistema GPC está basada en la monitorización de los tiempos de elución de una mezcla estándar de calibración, mediante un detector de UV conectado a la columna GPC y se debe realizar siempre que se cambie la columna, se detecte algún fallo en el sistema o se ponga en marcha el sistema. El proceso de calibración es el que sigue:

Se debe verificar el caudal de DCM a través del sistema, controlando el volumen eluido en 10 minutos, que debería ser de unos 45-55 ml correspondientes a un caudal entre 4,5-5,5 ml/min.

Anotar la P de la columna, la cual debe situarse entre 6-10 Psi.

Anotar la T de laboratorio.

Ajustar el detector de UV a una longitud de onda de 254 nm.

Situarse en el sistema de purificación un vial con un mínimo de 8 ml de la mezcla estándar de calibración para GPC, volumen necesario para el loop empleado, el cual es de 5 ml.

Determinar los tiempos de elución del *Ftalato*, *Metoxicloro* y *Perileno*.

Considerar período de elución de residuo ( $\Delta tr$ ), desde la inyección de la muestra en el sistema ( $t_0$ ) hasta el correspondiente a un 85% de elución del *Ftalato* ( $t_1$ ).

Considerar como período de elución de los pesticidas ( $\Delta tp$ ) entre el tiempo correspondiente a un 95% de elución del *Metoxicloro* ( $t_2$ ) y el tiempo justo inmediato a la elución del *Sulfuro* ( $t_3$ )

Considerar un período de limpieza del sistema de 10 min ( $\Delta tl$ ).

Reinyectar la mezcla de calibración tantas veces como sea necesario hasta determinar claramente los tiempos de elución ya referidos.

**Tabla 6** Tiempos de operación del GPC

<b>Tiempo (t)</b>	<b>Correspondencia</b>
0	Inicio proceso GPC
1	85% elución <i>Ftalato</i>
2	95% elución <i>Metoxicloro</i>

<b>Período (<math>\Delta t</math>)</b>	<b>Correspondencia</b>
$\Delta tr$	Residuo
$\Delta tp$	Analitos
$\Delta tl$	Limpieza

### 1.3.10.3.3 Protocolo experimental

Situar los viales con los extractos filtrados y convenientemente rotulados en el sistema de inyección automático GPC.

Revisar los valores de presión del sistema (6-10 Psi.)

Comprobar que el caudal de DCM en el sistema es de unos 4,5-5,5 ml/min.

Colocar erlenmeyers de 250 ml para colectar los extractos purificados.

Iniciar la secuencia automatizada de purificación GPC, en la cual ya se tienen en cuenta los tiempos de elución de residuo o de pesticidas (determinados previamente en la calibración del sistema), además de existir un sistema automatizado de limpieza del inyector y de su loop entre muestra y muestra.

De cada extracto se inyectan 8 ml para un loop de 5 ml.

Una vez colectados los diferentes extractos tapar con papel de aluminio los erlenmeyeres para minimizar la evaporación de DCM.

Proceder a concentrar el exceso de solvente por el sistema Kuderna-Danish en primer lugar (Ver sección **6.3.6**).

Finalizar la concentración de DCM y el cambio de solvente a n-hexano o isooctano mediante nitrógeno (Ver sección **6.3.5**).

### 1.3.11 PURIFICACIÓN SILICA <sup>(xviii)</sup>

La Silica es un material adsorbente generado por reacción de silicato de sodio y ácido sulfúrico, aunque se puede adquirir comercialmente.

Este sistema de purificación se recomienda para los hidrocarburos polinucleares aromáticos, como es el caso de gran parte de los pesticidas limitados por la Ecolabel así como para fenoles una vez derivatizados (pentaclorofenol y 2,4,5-T)

#### 1.3.11.1 Reactivos

Acetona (residuo pesticida o equivalente) Merck

n- Hexano (residuo pesticida o equivalente) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

Silica (residuo pesticida o equivalente) 60-100 mesh Ref. 3369 J.T. Baker

Eluyentes:

10%-90% (v/v) acetona-n-hexano

#### 1.3.11.2 Material

Jeringas de vidrio 5 ml. Ref.Gastigh 1005#. Hamilton

Filtros 13 mm, de 0,45 µm Ref. 6503-06. Lida

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Teflón

Vasos de precipitados

Embudo

Pipeta aforada 1 ml

#### 1.3.11.3 Técnica Experimental

##### 1.3.11.3.1 Silica



Activación de Silica: para eliminar los hidrocarburos clorados, pesticidas etc. Mantener a 150-160° durante unas 16 h.

Justo antes de emplear la Silica mantener durante unas 16 h a 130 °C en un recipiente de vidrio cubierto con papel de aluminio. Dejar enfriar en un desecador. De tanto en tanto almacenar la Silica en la mufla a dicha temperatura.

#### **1.3.11.3.2 Protocolo Experimental**

El protocolo experimental es idéntico al referido en la Sección 1.3.9.4.2

### 1.3.12 PURIFICACIÓN ALUMINA <sup>(xix)</sup>

La Alumina consiste en unos gránulos de óxido de aluminio altamente porosos que se emplea en cromatografía para separar los analitos de posibles interferencias en base a su diferente polaridad química. Está disponible en tres rangos de pH (ácido, neutro y básico).

En la purificación de pesticidas se estimó conveniente emplear la forma neutra, al ser la recomendada por la EPA.

#### 1.3.12.1 Reactivos

Acetona (residuo pesticida o equivalente) Merck

n- Hexano (residuo pesticida o equivalente) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

Alumina (residuo pesticida o equivalente) 60-100 mesh Ref. 3369 J.T. Baker

Eluyentes:

10%-90% (v/v) acetona-n-hexano

#### 1.3.12.2 Material

Jeringas de vidrio 5 ml. Ref.Gastigh 1005#. Hamilton

Filtros 13 mm, de 0,45 μm Ref. 6503-06. Lida

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Teflón

Vasos de precipitados

Embudo

Pipeta aforada 1 ml

#### 1.3.12.3 Técnica Experimental

El protocolo experimental es idéntico al referido en la Sección 1.3.9.4.2

## 1.4 TÉCNICAS ANÁLISIS.

### 1.4.1 INTRODUCCIÓN <sup>(xx)</sup>

El objetivo de estos apartados es el de dar una rápida visión de los dos métodos de análisis de muestras empleadas en el presente trabajo:

Cromatografía de Gases-Detector de Captura de electrones (GC-ECD).

Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas (GC-MS)

La cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD) es una técnica que permite la separación de mezclas complejas, pero una vez separados, detectados e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una mezcla problema, el único dato del que se dispone para la identificación de cada uno de ellos es el *tiempo de retención*. Este dato NO es suficiente para una identificación inequívoca por lo que en caso de emplearse esta técnica y detectarse analitos se debe proceder a una confirmación mediante (GC-MS)

La cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) permite la separación, detección, cuantificación e identificación de forma casi inequívoca de sustancias puras.

#### 1.4.1.1 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)

##### 1.4.1.1.1 Características

La espectrometría de masas es, sin duda, la técnica analítica instrumental más completa que existe hoy día, entre sus cualidades cabe citar:

Capacidad de identificación: puede identificar cualitativamente y de forma inequívoca casi cualquier tipo de sustancia, ya que proporciona un espectro de masas que es algo así como la “huella digital” de una sustancia.

Es cuantitativa: permite no sólo la identificación sino la cuantificación de las sustancias determinadas.

Permite el análisis de mezclas complejas, permitiendo el análisis simultáneo de sustancias con composición similar.

Posee una gran sensibilidad: según el sistema se pueden detectar hasta el orden de ppq (partes por cuatrillón en la técnica ICP-MS).

Es universal y específica: es decir puede analizar sustancias puras o mezclas de sustancias sólidas, líquidas o gaseosas y también es capaz de aislar una sustancia concreta en una matriz compleja.

Es una técnica rápida, pudiendo proporcionar espectros en décimas de segundo, por lo que se puede emplear para monitorización de procesos, suministrando información en tiempo real.

Puede proporcionar información estructural de la molécula analizada.

Proporciona información isotópica, pudiéndose aplicar para estudios de isótopos estables o radiactivos.

#### 1.4.1.1.2 Descripción del proceso

Supongamos que una mezcla es inyectada en el cromatógrafo de gases, gracias a su diferente volatilidad y a su diferente interacción con la columna capilar, los diferentes componentes de la mezcla eluyen a través de la columna a diferente velocidad, por lo que pasan al espectrómetro de masas individualmente.

La muestra en forma gaseosa que proviene del GC se introduce en la fuente de ionización a través de la interfase la cual se encuentra entre 150-300 °C para prevenir condensaciones, logrando con este sistema pasar de una presión atmosférica a la salida de la columna capilar al nivel de vacío existente en la cámara de ionización. Las moléculas de nuestra muestra al pasar a la cámara de ionización, se encontrarán con una corriente de electrones procedentes de un filamento incandescente de tungsteno. Realmente lo que tiene lugar en la cámara de ionización es una interacción: electrones ( $e^-$ ) $\Rightarrow$ átomos, ya que debido a las dimensiones relativas de los  $e^-$  respecto los átomos no se puede hablar de un verdadero choque o impacto.

Los electrones son acelerados al existir una diferencia de potencial entre el filamento y la cámara de ionización, mientras unos pequeños imanes se emplean para conseguir que la trayectoria de los  $e^-$  desde el filamento hasta el ánodo tenga forma de espiral aumentando así su recorrido y la probabilidad de colisión con las moléculas del analito en cuestión.

Por otro lado, una placa repulsora, de potencial positivo (el "repeller") se encarga de expulsar los iones positivos formados en la fuente, que a través de una rendija pasan a la zona de aceleración. Estos valores pueden ser controlados por lo que su optimización asegura que el máximo número de iones es expulsado de la cámara de ionización y enfocados hacia la entrada del cuadrupolo.

La corriente de iones al chocar contra el primer dínodo provocan la emisión de un elevado número de electrones, los cuales inciden sobre una placa cubierta por una lámina de fósforo, produciéndose fotones de luz que son detectados a su vez por el fotomultiplicador. En el fotomultiplicador los fotones se convierten de nuevo en electrones y esta corriente amplificada es la señal del detector.

La señal generada produce un pico gaussiano, cuya altura será proporcional a la concentración máxima alcanzada y cuya área será una medida proporcional de la cantidad total de compuesto detectado.

#### **1.4.1.2 Cromatografía de Gases-Detector Captura Electrones (GC-ECD)**

##### **1.4.1.2.1 Características**

El ECD es el detector más sensible disponible para el análisis de compuestos electrofílicos, como los hidrocarburos clorados que se encuentran en los residuos de pesticidas.

Es un detector cuantitativo

Es un detector no destructivo de la muestra.

#### 1.4.1.2.2 Descripción del proceso

La celda del ECD contiene un cilindro a través del cual fluye la muestra arrastrada por el gas portador. La superficie interna de dicho cilindro está recubierta de  $\text{Ni}^{63}$  el cual tiene una sensibilidad nominal de 15 milicurios (es radiactivo).

Para optimizar la respuesta del detector se combina el efluente de la columna capilar con otra fuente de gas, el llamado make-up.

Las partículas  $\beta$  emitidas desde el isótopo  $\text{Ni}^{63}$  ionizan el gas portador. Los iones resultantes y los electrones llegan hasta el ánodo colector, bajo la influencia de una diferencia de potencial entre la fuente y el colector.

La frecuencia se modifica automáticamente para mantener constante la corriente que sale desde el detector. La presencia de especies que absorben electrones para formar iones en el detector disminuye la corriente, al viajar mucho más lentamente los iones que los electrones. Son estas variaciones de frecuencia las que se emplean como señal de salida del detector y que indican la presencia o no de analitos electrófilos.

El gas portador debe ser  $\text{N}_2$  o una mezcla 95% argón-5% metano. Utilizando columnas capilares se utiliza un flujo de 5 ml/min o inferior de He o  $\text{H}_2$  se utiliza como gas portador, utilizándose  $\text{N}_2$  o argón-metano como gas complementario, siendo el flujo total de unos 30 ml/min o más.

---

## 1.4.2 ANÁLISIS CROMATOGRAFÍA GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS (GC-MS) <sup>(64-65-66-67-25-42)</sup>

Este procedimiento define el método para la determinación de pesticidas, herbicidas ácidos y fenoles mediante GC-MS. Es un método limitado a aquellos analitos para los que el análisis por GC-MS ha sido validado. Los procedimientos concretos de extracción, derivatización y purificación que deben emplearse en cada muestra deben ser definidos por el responsable del análisis.

### 1.4.2.1 **Reactivos**

n-Hexano (residuo pesticida o equivalente), C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck  
patrones pesticidas puros certificados (Ver sección 6.1)

#### 1.4.2.1.1 **Preparación de estándares**

Todos los pesticidas adquiridos deben ser certificados siempre que sea posible, manteniéndose dichos certificados en el laboratorio en que debe realizarse el análisis.

Estándar stock: para cada pesticida debe prepararse una solución a 1-2 mg/ml (la precisión de la balanza debería ser de  $\pm 0,0001$ g).

Cada estándar debe etiquetarse con el nombre del analito, la concentración y fecha de preparación. Se debe considerar un año de validez de cada *estándar stock*, a contar desde la fecha de su preparación.

Estándar interno: el *estándar interno* empleado es una solución comercial de 1,2-Diclorobenceno-d<sub>4</sub>, Naftaleno-d<sub>8</sub>, Acenafteno-d<sub>10</sub>, Criseno-d<sub>12</sub> y Perileno-d<sub>12</sub> en diclorometano, con una concentración de 4 mg/ml. Se prepara una solución estándar interno de forma que cada estándar esté presente a una concentración aproximada de 10 ng/ $\mu$ l.

---

Estándar stock mezcla: se prepara una mezcla de pesticidas, empleando n-hexano como solvente de forma que cada pesticida esté presente a una concentración entre 10-40 ng/μl. Cada estándar debe etiquetarse con el nombre del analito, la concentración y fecha de preparación. Se deben considerar seis meses de validez de cada estándar stock, a contar desde la fecha de su preparación, salvo en aquellos casos en que se pruebe que ha de ser inferior.

Estándares de calibración: mediante diluciones en serie a partir del estándar stock mezcla y empleando n-hexano como solvente, se deben preparar cinco estándares de diferentes concentraciones entre 0,005-0,1 ng/μl. Dichas diluciones se emplearán como estándares de calibración.

A cada estándar de calibración se debe añadir el volumen correspondiente de estándar interno de forma que la concentración de cada analito del estándar interno sea en TODAS los estándares de calibración de 0,1 ng/μl.

#### **1.4.2.2 Material**

VG Fisons MD800 GC/MS equipado con software para adquisición y análisis de datos (programa Mass.lab).

Columna DB-5MS J&W Scientific 30m x 0,25 mm x 0,25 μm o columna equivalente.

##### **1.4.2.2.1 Preparación del equipo GC**

Si la columna instalada no es la correcta se debe proceder como sigue:

Situar un septum nuevo y extraer el inyector splitless y limpiar con mezcla crómica y acetona. En caso de que el inyector previamente instalado sea el split, cambiar por el splitless. Este procedimiento se debe seguir siempre que se cambie de columna o si se observan los picos de los cromatogramas con cola.

Conectar la nueva columna de forma que unos 2 mm se inserten en la cámara de ionización del MS. El otro extremo se inserta unos 64 mm en el inyector splitless. Consultar el manual MD800 <sup>(62)</sup>.



Situar las condiciones de operación en el programa Mass.lab. Considerar que el analista puede modificar la rampa de T del GC para optimizar la separación de los diferentes analitos en los cromatogramas. Ver Tabla 7.

**Tabla 7 Condiciones del GC y del inyector**

T inyector (°C)	Rampa de T del GC-MS		
	Tiempo (min)	Temp (°C)	Rampa (°C/min)
200	3,00	160	5,00
	3,00	200	5,00
	0,00	270	

Valvula purga (s)	Válvula split (s)
45	45

#### 1.4.2.2.2 Preparación del equipo MS

El MS debe ajustarse mediante el software disponible (TUNE), implementando los valores que se indican en la Tabla 8. Ver ANEXO 5

Las condiciones óptimas obtenidas finalmente para el análisis de los pesticidas limitados por la Ecolabel son:

**Tabla 8 Condiciones del MS**

PARÁMETRO	VALORES
Temperatura de la fuente	200 °C
Energía de los electrones	70 eV
Corriente emisión	100-200 $\mu$ A (recomendado 100)
Tipo de barrido	Full-Scan o SIM
Ionización	EI+
Retraso por elución del solvente (min)	2,25

### 1.4.2.3 Técnica Experimental

#### 1.4.2.3.1 Modo Full-Scan

Para determinar el orden de elución de los diferentes analitos y optimizar las condiciones del GC se debe proceder tal y como sigue:

Indicar en el programa Mass.lab las condiciones de T del GC y las del MS, el cual trabajará en Full-Scan para realizar un barrido completo de todos los iones de los diferentes analitos

Inyectar 2-3  $\mu$ l de la mezcla de analitos junto con los estándares internos a una concentración aproximadamente de 1 ng/ $\mu$ l.

Una vez obtenido el cromatograma completo, determinar los tiempos de retención de cada analito, comprobar la correcta elución y comparar los espectros de los analitos inyectados con los presentes en las librerías instaladas en el software del programa (LIBXT, NIST).

**1.4.2.3.2 Modo Selected Ion Monitoring (SIM)**

En base al cromatograma obtenido en la sección **1.4.2.3.1** ordenar los analitos en grupos:

El número de analitos en cada grupo depende de la sensibilidad requerida. A mayor sensibilidad necesaria menor número de iones a monitorizar que se pueden incluir por grupo.

Una buena sensibilidad se obtiene cuando en cada grupo hay entre 4-6 analitos (ente pesticidas y estándar interno).

Examinar los grupos para asegurar que los tiempos de retención de cada grupo no se superponen o que algún analito eluye en el tiempo en blanco entre grupo y grupo(Ver Tabla 28).

Para cada analito se escogen dos iones para monitorizar. Generalmente uno de ellos es el que aparece como mayoritario en el espectro. Para el caso de los pesticidas organoclorados se suelen escoger pares isotópicos de iones (M y M+2) en los que la variación de la masa depende de la presencia de Cl<sub>35</sub> o Cl<sub>37</sub>.

Los iones recomendados para los pesticidas limitados por la Ecolabel y para el estándar interno empleado son los que siguen.

**Tabla 9 Iones primario y secundario de los pesticidas limitados por la Ecolabel y de los estándares internos.**

	PESTICIDA	Ion 1 Cuantificación	Ion 2	TIEMPO ANÁLISIS (min)	Grupos
	Hexaclorobenceno	284	179	7,50-11,50	<b>1.1</b>
	Fenantreno-d <sub>10</sub>	188	94		
<b>1</b>	Heptacloro	100	272	13,10-13,80	<b>1.2</b>
	Aldrín	263(66)	261		
	Clordano (1)	373	375	16,20-17,80	<b>1.3</b>
	Clordano (2)	373	375		
	Clordano (3)	373	375		
	o,p'-DDE	246	248		
	p,p'-DDE	246	248	18,10-19,80	<b>2.1</b>
	Dieldrín	263(79)	265		
	o,p'-DDD	235	237		
	Endrín	263	265 (81)		
	p,p'-DDD	235	237	20,10-21,00	<b>2.2</b>
<b>2</b>	o,p'-DDT	235	237		
	Endrín aldehído	345	250 (67)		
	p,p'-DDT	235	237	21,80-25,00	<b>2.3</b>
	Captafol	79	77		
	Endrín Cetona	317	319 (67)		
	Criseno-d <sub>12</sub>	240	120		

Bloque 1: método cuantificación ECOL1.MTH / patrón interno *Fenantreno d-10*

Bloque 2: método cuantificación ECOL2.MTH / patrón interno *Criseno d-12*

El "dwell time" (tiempo de scan de cada ión) se debe seleccionar para cada grupo de forma que la suma de los tiempos de scan de todos los analitos del grupo más el

---

“interchannel delay” (tiempo entre la monitorización de cada ion) suma 1.0 s aproximadamente.

### 1.4.2.3.3 Protocolo de muestras

Una vez determinadas las condiciones óptimas de elución de los analitos (rampa de T) y conocidos los tiempos de elución de los diferentes pesticidas mediante una serie de inyecciones en modo Full Scan, se procede como sigue:

Se deben establecer las rectas de calibración para cada uno de los pesticidas. Si el GC-MS ya ha sido calibrado previamente solo requiere una verificación de la adecuación de las rectas de calibrado (ver apartado 1.4.2.3.4). Si se supera el límite de aceptación de las rectas de calibrado se debe recalibrar empleando cinco concentraciones estándar.

El orden de inyección de las muestras es el que sigue:

**Fig. 2 Orden de inyección de muestras en el GC-MS**

Blanco de solvente
Estándar 1 de calibración (menor concentración)
Estándar 2 de calibración
Estándar 3 de calibración
Estándar 4 de calibración
Estándar 5 de calibración (mayor concentración)
Blanco de solvente
Estándar 3 de calibración (verificación)
Blanco de la extracción
Matrix spike de la muestra (si es posible)
Duplicado de Matrix Spike
Extractos de muestra (15 como máximo)
Blanco de solvente
Estándar 3 de calibración (verificación)

#### 1.4.2.3.4 Calibración del instrumento

El criterio para aceptar o rechazar una recta de calibrado viene determinado por el %RSD (% desviación estándar relativa) de cada uno de los analitos, este debe ser inferior o igual a un 30% (siempre que sea posible)<sup>(64)</sup>

#### Ec. 3 Factor de respuesta relativo

$$RF = \frac{A_i \times C_{is}}{A_{is} \times C_i}$$

- . **RF**: factor de respuesta relativo correspondiente al analito
- . **A<sub>i</sub>**: área integrada del cromatograma correspondiente al ion primario o cuantitativo del pesticida objeto de análisis.
- . **A<sub>is</sub>**: área integrada del cromatograma correspondiente al ion primario o cuantitativo del estándar interno.
- . **C<sub>i</sub>**: concentración del analito estándar de calibración.
- . **C<sub>is</sub>**: concentración del estándar interno

Tan pronto como sea posible tras haber completado la secuencia de muestras, se deben calcular los RF (Factores de respuesta relativos) para cada uno de los analitos presentes en los estándares de calibración, para ello se procede como sigue:

- . Se genera el cromatograma correspondiente al ion primario o de cuantificación para cada analito.
- . Se genera la recta de calibración para cada uno de los pesticidas (RF vs Concentración) mediante el programa de software Mass.lab incorporado al GC.MS<sup>(63)</sup>.

Para cada uno de los pesticidas analizados se calculan entre otros, los siguientes parámetros:

- . **RT<sub>m</sub>**= tiempo de retención promedio

- .  $RRT_m$ =tiempo de retención relativo promedio
- .  $RF_m$ =factor de respuesta relativo promedio
- .  $\%RSD$ = porcentaje de la desviación relativa estándar.
- .  $\% REC$ =porcentaje de recuperación del analito

Las ecuaciones empleadas para el cálculo de cada uno de los parámetros son la que siguen:

**Ec. 4 Tiempo de retención promedio**

$$RT_m = \frac{\sum_{i=1}^n RT_i}{n}$$

- .  $RT_m$ : tiempo de retención promedio del analito
- .  $RT_i$  : tiempo de retención absoluto del analito
- .  $n$ : número de medidas

Para cada analito se genera una “ventana” de detección de los iones primario y secundario,  $RT_m \pm 0,5$  s, dado que pueden haber pequeñas variaciones de los RT a lo largo de todos los análisis.

**Ec. 5 Tiempo de retención relativo promedio**

$$RRT_m = \frac{\sum_{i=1}^n (RT_i - RT_{is})}{n}$$

- .  $RRT_m$ : tiempo de retención relativo promedio del analito
- .  $RT_i$  : tiempo de retención absoluto del analito
- .  $RT_{is}$ : tiempo de retención absoluto del estándar interno
- .  $n$ : número de medidas



**Ec. 6 Factor de respuesta relativo promedio**

$$RF_m = \frac{\sum_{i=1}^n RF_i}{n}$$

- .  $RF_m$  : factor de respuesta relativo promedio
- .  $RF$ : factor de respuesta relativo
- .  $n$ : número de medidas

**Ec. 7 % de desviación relativa estándar de los factores de respuesta**

$$\%RSD = \frac{SD_{RF}}{RF_m} \times 100$$

Ecuación en la que es necesario calcular  $SD_{RF}$

**Ec. 8 Desviación relativa de los factores de respuesta**

$$SD_{RF} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (RF_i - RF_m)^2}{n}}$$

- .  $\%RSD$ : porcentaje de desviación relativa estándar
- .  $SD_{RF}$ : desviación estándar de los factores de respuesta
- .  $RF_i$ : factor de respuesta relativo
- .  $RF_m$ : factor de respuesta relativo promedio

Las rectas de calibración se pueden considerar satisfactorias cuando el  $\%RSD$  de cada uno de los analitos sea inferior o igual a un 30%.

**Fig. 3 Criterio de aceptación de las rectas de calibración para cada analito**

$$\%RSD \leq 30\%$$

Si alguno de los analitos presenta una calibración fuera del rango de aceptación (%RSD superior a un 30%) se puede intentar repetir alguno de los estándares de calibración para intentar solventar el problema, en caso contrario se debe repetir todo el proceso de calibración (Ver Fig. 2).

**Ec. 9      % Recuperación de cada pesticida**

$$\% REC = \frac{C_{calc}}{C_{nom}} \times 100$$

- . **%REC**: porcentaje de recuperación de cada analito
- . **C<sub>nom</sub>**: concentración inicial de analito (inyectada en los patrones)
- . **C<sub>calc</sub>**: concentración calculada de recuperación

#### 1.4.2.3.5 Cuantificación de muestras

Una vez establecidas las rectas de calibración tal y como se indica en el punto 1.4.2.3.4, es posible proceder a la cuantificación de los extractos procedentes de muestras.

Cada muestra es inyectada siguiendo el orden establecido en la Fig. 2.

Se procede a escanear cada cromatograma buscando los iones primarios o de cuantificación de cada uno de los pesticidas prohibidos por la Ecoetiqueta europea, para ello se tendrá en cuenta el RRT (tiempo de retención relativo).

Si en una muestra se observa la presencia de algún analito al detectarse el ion primario en el RRT correspondiente, se procede a confirmar buscando el ion secundario o de confirmación en el mismo RRT.

Si para un analito determinado se detectan tanto el ion primario como el secundario en el tiempo de retención relativo de los patrones,  $RRT \pm 0,50$  s, se procede a la cuantificación de la muestra con la siguiente ecuación:

#### Ec. 10 Cuantificación de la concentración

$$C_i = \frac{(A_i \times C_{is})}{(RF \times A_{is})}$$

.**RF**: es el factor de respuesta relativo del pesticida

.**A<sub>i</sub>**: es el área integrada del cromatograma correspondiente al ion primario o cuantitativo del analito objeto de análisis.

.**A<sub>is</sub>**: es el área integrada del cromatograma correspondiente al ión primario o cuantitativo del estándar interno.

.**C<sub>i</sub>**: es la concentración del pesticida presente en la muestra y calculada a partir de las rectas de calibración previamente determinadas.

.**C<sub>is</sub>**: es la concentración del estándar interno añadido a la muestra.

### 1.4.3 ANÁLISIS CROMATOGRAFÍA GASES-DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES (GC-ECD)<sup>(xxi-xxii-xxiii-xxiv-xxv-xxvi)</sup>

Este es el protocolo de trabajo empleado en el Southwest Research Institute. Consiste en el análisis de los diferentes extractos, una vez purificados, mediante un sistema GC-ECD.

Dado que sólo se dispone del tiempo de retención de los analitos como criterio de identificación, se hace necesario una confirmación mediante una segunda columna capilar o mediante otro método cuantitativo, como podría ser el descrito en la sección 1.4.2 (GC-MS). En este caso se describe el sistema de doble columna, estando éstas unidas a un inyector de forma que con una único pinchazo es posible el análisis y la confirmación.

#### 1.4.3.1 **Reactivos**

n-Hexano (residuo pesticida o equivalente), C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck  
patrones pesticidas puros certificados (Ver sección 1.1)

El protocolo de preparación de estándares y mezclas patrón es idéntico al referido en la sección 1.4.2.1.1.

#### 1.4.3.2 **Material**

GC-ECD Hewlett-Packard Instrument GC21  
Columna DB-608 J&W Scientific 30 m x 0,53 mm x 1,0 µm  
Columna DB-1701 J&W Scientific 30 m x 0,53 mm x 1,0 µm

#### 1.4.3.2.1 **Preparación del equipo GC**

A continuación se refieren las condiciones analíticas recomendadas con el equipo GC-ECD para el análisis de pesticidas organoclorados.

---

Gas portador: He  
Flujo de gas portador por la columna: 5 ml/min  
Make-up: N<sub>2</sub>  
Temperatura del inyector: >200°C  
Modo de inyección: On-Column  
Tipo de inyector: splitless, Grob.  
V inyección: 1 µl al ser el inyector automático.  
Rampa de Temperaturas:

T inicial= 150 °C            t=4 min            rampa= entre 5-6 °C/min  
T final= 275 °C            t=10 min

### 1.4.3.3 Técnica Experimental

#### 1.4.3.3.1 Calibración del instrumento

Antes de proceder al análisis de muestras, se debe calibrar el sistema GC-ECD inyectando un mínimo de 3 concentraciones para determinar la sensibilidad y linealidad del instrumento. Se inyectan por duplicado y en orden creciente de concentración

Se adjunta en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** los resultados de la calibración efectuada durante la estancia en el SwRi.

Dicha calibración se debe efectuar siempre que se realice alguna modificación del sistema (cambio de columna, limpieza...) o si no se alcanzan los criterios de aceptación de la calibración.

Una vez realizada la calibración, para cada uno de los pesticidas analizados, se calculan los siguientes parámetros, según las ecuaciones descritas en la sección 1.4.2.3.4 y 1.4.2.3.5

.  $RT_m$ = tiempo de retención promedio

- 
- .  $RRT_m$ = tiempo de retención relativo promedio
  - .  $RF_m$ = factor de respuesta relativo promedio
  - .  $\%RSD$ = porcentaje de la desviación relativa estándar.
  - .  $\% REC$ = porcentaje de recuperación del analito

#### 1.4.3.3.2 Cuantificación de muestras

Un analito se considera identificado si se observa un pico dentro de la ventana de tiempo correspondiente en el cromatograma correspondiente a la elución a través de la columna DB-1701 y en el cromatograma correspondiente a la elución a través de la columna DB-608.

Si en una muestra se observa la presencia de algún analito al detectarse un pico en el  $RRT \pm 0,50$  s correspondiente, se procede a confirmar buscando su homólogo en el  $RRT \pm 0,50$  s correspondiente a la segunda columna.

Si para un analito determinado se detecta señal tanto en el cromatograma correspondiente a la DB-1701 como en el de la DB-608, se procede a la cuantificación de la muestra, empleando la EXPERIMENTAL PROTOCOLO DE ANÁLISIS DE LOS PESTICIDAS LIMITADOS POR LA ECO-LABEL

### 1.5 PATRONES DE PESTICIDAS

#### 1.5.1 PATRONES PUROS

El presente trabajo se ha realizado empleando patrones puros certificados de los pesticidas limitados por la Ecoetiqueta europea. Dichos patrones han sido obtenidos por el Laboratorio de Control de la Contaminación del INTEXTER a través de dos fuentes:

Cedidos generosamente por la *US Environmental Protection Agency. Pesticides Repository. C/o ManTech Environmental Technology 2 Triangle Drive. Research Triangle Park, NC 27709.*

Mediante la compra de pesticidas certificados de la casa. Dr. Ehrenstorfer GmbH a la empresa Crom-Lab. S.L. C/ Acer 30-32, Edificio Sertram , PI2 M.3ª- 08030-Barcelona.

En la Tabla 1 se citan los porcentajes de pureza de los pesticidas puros empleados, adjuntándose en el **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** los certificados de pureza y de importación.

**Tabla 1** Porcentajes de pureza de los patrones de pesticidas puros empleados

<b>PESTICIDA</b>	<b>% pureza E.P.A</b>	<b>% pureza Dr. Erhenstorfer GmbH</b>
Hexaclorobenceno	99,7	
Captafol		99,4
<i>o,p'</i> -DDE		99,3
<i>p,p'</i> -DDE		99,7
<i>o,p'</i> -DDD	99,2	99,7
<i>p,p'</i> -DDD	99,8	98,7
<i>o,p'</i> -DDT		99,8
<i>p,p'</i> -DDT	99,7	99,7
Clordano	100	
Heptacoloro	99,9	

---

<i>Aldrin</i>	99,0	
<i>Dieldrín</i>	98,8	98,1
<i>Endrín</i>	96,6	98,4
<i>2,4,5-T</i>	97,5	98,4
<i>Pentaclorofenol</i>	99,5	98,6
<i>Canfecloro</i>	100	



## 1.5.2 DISOLUCIONES PESTICIDAS ORGANOCORADOS

Además de los patrones de pesticidas puros citados previamente, en el desarrollo del presente trabajo experimental se emplearon soluciones de concentraciones certificadas de los siguientes pesticidas organoclorados:

Solución POC's concentrado en n-Hexano (Ver Tabla 2)

Solución POC's diluida en isooctano (Ver Tabla 2)

**Tabla 2 Solución POC's concentrada en n-hexano y diluida en isooctano**

<b>PESTICIDA</b>	<b>POC's concentrada (ng/<math>\mu</math>l)</b>	<b>POC's diluida (ng/<math>\mu</math>l)</b>
<i>alpha-HCH</i>	10	0,105
<i>beta-HCH</i>	10	0,102
<i>gamma-HCH</i>	10	0,106
<i>delta-HCH</i>	10	0,100
<i>epsilon-HCH</i>	-	0,100
<i>Heptacloro</i>	10	0,206
<i>Aldrin</i>	10	0,200
<i>Heptacloro epoxido</i>	10	0,208
<i>o,p'-DDE</i>	10	0,204
<i>Endosulfan I</i>	10	0,198
<i>Dieldrin</i>	10	0,203
<i>p,p'-DDE</i>	10	0,202
<i>o,p'-DDD</i>	10	0,399
<i>Endrin</i>	10	0,199
<i>Endosulfan II</i>	10	0,200
<i>p,p'-DDD</i>	10	0,408
<i>o,p'-DDT</i>	10	0,404
<i>Endrin Aldehido</i>	10	0,400
<i>Endosulfan Sulfate</i>	10	0,404
<i>p,p'-DDT</i>	10	0,407

\* Se indican sombreados aquellos pesticidas limitados por la Ecoetiqueta europea presentes en las soluciones POC's

### 1.5.3 DISOLUCION PATRON INTERNO ESTÁNDAR

La solución empleada como patrón interno estándar en la GC-MS, con concentración así mismo certificada es la que se relaciona en la Tabla 3. Como se puede observar los analitos organoclorados empleados como estándar interno son deuterados para una mejor detección mediante la cromatografía de gases-espectrometría de masas.

**Tabla 3 Solución patrón interno estándar**

<b>Componente</b>	<b>%</b>
<i>Acenafteno-d10</i>	0,4
<i>Criseno-d12</i>	0,4
<i>1,4-Diclorobenceno-d4</i>	0,4
<i>Naftaleno-d8</i>	0,4
<i>Perileno-d12</i>	0,4
<i>Fenantreno-d10</i>	0,4
<i>Cloruro de metileno</i>	97,6

### 1.5.4 MEDIDAS DE PROTECCIÓN

La exposición a todos los reactivos citados debe minimizarse dada su condición de analitos altamente tóxicos i/o cancerígenos para los mamíferos (Ver Tabla 4), para ello se han empleado guantes de latex, ropa de protección, y en algunos casos gafas protectoras. En la medida de lo posible la manipulación de estos analitos se ha realizado bajo campana extractora.

Tabla 4 Características toxicológicas patrones puros de pesticidas OC

<b>PESTICIDA</b>	<b>CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS</b>	<b>LD50 dosis aguda oral en ratas (mg/kg)</b>
<i>Hexaclorobenceno</i>	Cancerígeno-Tóxico	10
<i>Captafol</i>	Cancerígeno-Tóxico	6200
<i>o,p'-DDE</i>	Dañino	-
<i>p,p'-DDE</i>	Dañino	-
<i>o,p'-DDD</i>	Tóxico	-
<i>p,p'-DDD</i>	Sospechoso de cancerígeno- Tóxico	113
<i>o,p'-DDT</i>	Sospechoso de cancerígeno	-
<i>p,p'-DDT</i>	Cancerígeno-Tóxico	250-300
<i>Clordano</i>	Cancerígeno-Tóxico	40
<i>Heptacoloro</i>	Cancerígeno-Tóxico	40
<i>Aldrin</i>	Sospechoso cancerígeno- Tóxico	67
<i>Dieldrín</i>	Sospechoso cancerígeno- Tóxico	40-87
<i>Endrín</i>	Tóxico	5-45
<i>2,4,5-T</i>	Dañino	500
<i>Pentaclorofenol</i>	Sospechoso cancerígeno- Tóxico-Irritante	2103
<i>Canfecloro</i>	Cancerígeno	50

---

## 1.6 ALGODÓN CRUDO

La fibra cruda de algodón empleada en el presente proyecto se ha obtenido a través de la empresa importadora *Artigas Cotton Agents*, con sede en Barcelona, la cual ha procedido al envío de muestras de aproximadamente 1 kg de algodón crudo procedente de los siguientes países productores:

Grecia

Méjico

Argentina

Australia

Israel

Turquía

ex - URRS (C.E.I)

Se adjuntan certificados fitosanitarios del algodón importado (Ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)

Se adjunta el certificado de la Direcció General de Qualitat Ambiental. Generalitat de Catalunya. Departament de Mediambient. Conforme el Laboratorio de Control de la Contaminación del INTEXTER, está autorizado a realizar las pruebas necesarias para la obtención de la Ecoetiqueta europea para ropa de cama y camisetas de algodón o mezclas algodón-poliéster en base a la directiva inicial establecida en 1996. (Ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). En la actualidad dicha directiva ha sido modificada (1999) como ya se ha mencionado repetidamente en el presente trabajo, por un nuevo documento genérico para artículos textiles.

## 1.7 TÉCNICAS

### 1.7.1 INTRODUCCIÓN.

El 1 de marzo de 1996 la Comisión Europea procede a aprobar el Doc. XI/395/95-Rev. 3 Orig <sup>(2)</sup> el que se establecen los criterios ecológicos para la concesión de la etiqueta ecológica a camisetas y ropa de cama (sábanas, fundas de almohadas, edredones, colchas, cenefas...) confeccionados 100% de algodón o mezclas algodón-poliéster.

Desde este momento se hace patente la necesidad de desarrollar el presente proyecto en el INTEXTER, al ser el organismo acreditado por el Departament de Medi Ambient de la Generalitat de Catalunya para realizar los análisis y test pertinentes de cara a la concesión o no de dicha ecoetiqueta (Ver **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

La última revisión de la Etiqueta ecológica para artículos textiles corresponde al documento: Decisión de la Comisión de 17 de febrero de 1999 por la que se establecen los criterios ecológicos para la concesión de la etiqueta ecológica comunitaria a los productos textiles. *DOL 5-3-1999. L57/21 –57/31.*

Uno de los criterios ecológicos especificados en la Directiva mencionada (1999), corresponde al contenido en pesticidas del hilo de algodón crudo, estableciéndose un límite de 0.05 mg/kg hilo para los pesticidas:

*Aldrín, Captafol, Clordano, DDT, Dieldrín, Endrín, Heptaclo, Hexaclorobenceno, Hexaclorociclohexano, 2,4,5-T, Clorodimeformo, Clorobenzilato, Dinoseb ( y sales) y Monocrotofós.*

El procedimiento general de análisis de pesticidas organoclorados se puede resumir en tres fases:

una primera fase de preparación de muestra y extracción que permite aislar los analitos de interés.

una segunda fase de purificación

---

finalmente el análisis instrumental que permita la identificación, confirmación y cuantificación de los residuos y que en general se realiza mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones GC-ECD o cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas GC-MS.

Las fases de extracción y purificación de la muestra se consideran críticas,<sup>(4)</sup> ya que se deben recuperar cuantitativamente los analitos de interés para su posterior análisis.<sup>(1)</sup>

**Fig. 1 Fases del proceso de análisis de pesticidas**

---

## 1.7.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE LA MUESTRA <sup>0</sup>

### 1.7.2.1 Material

Balanza analítica calibrada Mettler H54AR de 160 g de capacidad y una precisión de  $\pm 0,0001$  g

Granatario Sartorius 1216 MP de 120 g de capacidad y una precisión de  $\pm 0,01$  g

Estufa de laboratorio Selecta.

Desecador

### 1.7.2.2 Técnica Experimental

Se deben pesar exactamente tres muestras de aproximadamente 5 g, con una precisión de  $\pm 0,01$ g como mínimo, dado que los porcentajes de humedad del algodón no son excesivamente elevados se recomienda una precisión de  $\pm 0,0001$  g.

Las muestras pesadas para el cálculo del porcentaje de humedad se deben mantener durante una noche a 105 °C en la estufa de laboratorio y posteriormente dejar enfriar una hora en el desecador hasta peso constante.

Calcular el porcentaje de humedad según la ecuación

#### Ec. 1 Porcentaje de humedad

(%) **hd**: es el porcentaje de humedad de la muestra

**ms**: masa seca

**mt**: masa total de muestra

Las concentraciones de los diferentes analitos a analizar deben referirse a muestra seca.

### 1.7.3 EXTRACCIÓN SOXHLET AUTOMATIZADA

La extracción de los pesticidas de la fibra de algodón cruda se ha realizado mediante una Extracción Soxhlet Automatizada. (---). Los resultados obtenidos son totalmente comparables a una Extracción Soxhlet <sup>(1)</sup>

#### 1.7.3.1 Reactivos

Diclorometano (residuo pesticida o equivalente), (DCM)CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Merck  
n-Hexano (residuo pesticida o equivalente), C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

#### 1.7.3.2 Material

Extractor Soxhlet automatizado SOXTEC® System HT2 , con baño de aceite y controlador de temperatura.

Cartuchos extracción celulosa 33 x 80 Macherey-Nagel. Ref. MN645

Vasos extracción de aluminio Tecator. Ref. 1000-2290

Adaptadores de cartuchos de celulosa de Ø 33 mm. Ref. 1622-0030

Juntas de Vitón. Ref 1000-2705 (Resistentes al Diclorometano)

Balanza analítica calibrada Mettler H54AR de 160 g de capacidad y una precisión de ± 0,0001 g

Granatario Sartorius 1216 MP de 120 g de capacidad y una precisión de ± 0,01 g

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Pipetas Pasteur.

Espátula

#### 1.7.3.3 Técnica Experimental

Se procede inicialmente tal y como indica la EPA 3541 <sup>(v)</sup>. En primer lugar las muestras de algodón crudo al ser fibrosas se deben cortar y deshilar para favorecer la posterior extracción de los pesticidas a analizar.



---

Paralelamente al procedimiento 1.3.2 se realiza la extracción Soxhlet, para ello se procede a:

Comprobar el nivel de aceite en el baño y añadir en caso de ser necesario.

Situar el termostato a 105°C siempre que el solvente empleado sea diclorometano.

Abrir el circuito de agua refrigerante, el cual debe ajustarse a unos 2 l/min para prevenir la pérdida de DCM en los condensadores.

Situar aproximadamente unos 100 ml de DCM en el vasito de aluminio.

Una vez realizado el protocolo previo se introduce la muestra de algodón en el dedal de celulosa y pasar a ensamblar el dedal de celulosa al adaptador, situar el vasito de aluminio en el SOXTEC® y sumergir el dedal en el solvente.

Situar los dedales en posición "boiling" durante 60 minutos, es decir sumergidos en el solvente, y proceder a extraer durante este tiempo manteniendo las válvulas del condensador en la posición de "OPEN", de forma que el solvente evaporado sea refrigerado y pase de nuevo al vasito de aluminio.

Una vez transcurrida la hora, situar los dedales en posición de "rinsing", es decir suspendidos sobre la superficie del solvente durante 60 min manteniendo las válvulas del condensador abiertas.

Pasado el nuevo período de tiempo cerrar las válvulas de los condensadores 1/2 de vuelta para ir colectando el solvente. Cuando resten entre 2 y 5 ml de DCM en los vasitos cerrar completamente las válvulas y sacar los vasitos de aluminio del SOXTEC®. (NUNCA DEJAR EVAPORAR TOTALMENTE). Cerrar el circuito de agua refrigerante y apagar el sistema si no se realizan seguidamente más extracciones.

Se debe transferir cuantitativamente el extracto a un vial de 12 ml de fondo plano, añadir diclorometano 3 veces al vasito de aluminio para arrastrar posibles residuos de pesticida y transferir de nuevo al vial.

---

Finalmente se debe proceder a un intercambio de solvente del extracto graso pasando del DCM al n-hexano, para ello se sitúan los viales bajo una corriente de N<sub>2</sub> de forma que se evapore el DCM hasta que quede una mínima cantidad (**NUNCA DEJAR EVAPORAR TOTALMENTE**), añadir 1-2 ml de n-hexano y dejar evaporar 1-2 min más los restos de DCM.

Proceder al intercambio cuantitativo de vial, pasando con una pipeta Pasteur la muestra desde el vial de 12 ml al de 4 ml. Añadir 3 veces n-hexano al vial de 12 ml para asegurarnos de la recuperación completa. Enrasar el vial de 4 ml hasta el volumen final deseado (4 ml en principio) y almacenar a 4 °C si no se procede a la purificación inmediatamente.

#### **1.7.3.3.1 Adición de muestreador del proceso**

Cada cierto número de muestras de algodón (unas 15) es conveniente realizar una adición de una disolución que contenga los pesticidas que se pretende detectar, la llamada matrix spike., a dos muestras por separado de algodón.

Estas dos muestras de algodón servirán de muestreadores de los procesos de extracción, concentración y purificación ya que serán analizadas dentro del protocolo de inyección de muestras en el GC-MS tras los estándares de calibración y los blancos de solvente.

Para la preparación de dicha disolución se empleará el estándar stock mezcla diluido tantas veces como sea necesario en función del volumen añadido, considerando que el volumen final tras la concentración y purificación es de 1 ml.

#### 1.7.4 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CERAS

En algunos casos puede ser interesante o necesario conocer el contenido en ceras graso del algodón a analizar, SÓLO en estos casos es necesario proceder como sigue.

##### 1.7.4.1 Reactivos

- Diclorometano (residuo pesticida o equivalente), (DCM)CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Merck

##### 1.7.4.2 Material

- Extractor Soxhlet automatizado SOXTEC® System HT2 , con baño de aceite y controlador de temperatura.
- Cartuchos extracción celulosa 33 x 80 Macherey-Nagel. Ref. MN645
- Vasos extracción de aluminio Tecator. Ref. 1000-2290
- Adaptadores de cartuchos de celulosa de Ø 33 mm. Ref. 1622-0030
- Juntas de Vitón. Ref 1000-2705 (Resistentes al Diclorometano)
- Balanza analítica calibrada Mettler H54AR de 160 g de capacidad y una precisión de ± 0,0001 g
- Espátula

##### 1.7.4.3 Técnica Experimental

Situar los vasitos de aluminio que contendrán el extracto graso en el desecador durante 1 h hasta peso constante. Tararlos en una balanza analítica con una precisión de ± 0,0001 g.

Proceder tal y como se refiere en la **Sección 1.3.3.3** hasta el punto en que se recoge entre 2-5 ml de solvente tras las 2 h de extracción. En este caso evaporar por completo el DCM, devolver los vasitos de aluminio con el extracto y situar en el desecador para dejar enfriar durante 1 h hasta peso constante.

Para el cálculo del porcentaje de ceras de la muestra proceder según la ecuación:

**Ec. 2      % ceras de la muestra**

**%c:** porcentaje ceras de la muestra

**mf:** masa final del vaso de aluminio más el extracto graso

**mi:** tara del vaso de aluminio

**mt:** masa total de muestra

Estos extractos no pueden emplearse en las fases de purificación y análisis para la determinación de pesticidas dado que el solvente empleado para la extracción se ha evaporado completamente.

---

### 1.7.5 CONCENTRACIÓN POR NITRÓGENO <sup>(1)</sup>

Técnica a emplear para la reducción de volúmenes o intercambio de solventes si el volumen de muestra inicial no supera los 15 ml.

#### 1.7.5.1 Reactivos

N<sub>2</sub> gas calidad N-50 como mínimo

- Diclorometano (residuo pesticida o equivalente), (DCM)CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Merck
- n- Hexano (residuo pesticida o equivalente) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

#### 1.7.5.2 Material

Viales de 4 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7138

Viales de 1 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Chromacol Ref.100 x 8-6RTI

Concentrador de N<sub>2</sub> Six-Port Mini- Vap CRS. Ref. 201006

#### 1.7.5.3 Técnica Experimental

Si es posible situar los viales en un baño de agua templada (entre 30 °C –35 °C) manteniendo el nivel del solvente por debajo del agua. De no disponer de un baño de agua operar a T ambiente.

Limpiar las líneas de gas de acero inoxidable del evaporador con n-hexano o acetona, sumergiendo dichas líneas en un vial con el solvente limpiador. Lavar también las paredes externas varias veces y secar antes de su uso.

Burbujear suavemente N<sub>2</sub> sobre los viales a concentrar. NO PERMITIR EN NINGUN CASO QUE SE EVAPORE TOTALMENTE. Para proceder a intercambiar el DCM por n-hexano dejar concentrar el vial con la muestra inicial hasta 1-2 ml, añadir 1-2 ml de n-hexano y dejar evaporar nuevamente, dada la mayor volatilidad del DCM

respecto el n-hexano aseguramos su total eliminación. Finalmente enrasar con n-hexano al V final deseado.

#### 1.7.6 CONCENTRACIÓN MEDIANTE KUDERNA-DANISH (K-D) <sup>(1)</sup>

Técnica a emplear para la reducción de volúmenes o intercambio de solventes si el volumen de muestra es superior a 150 ml

##### 1.7.6.1 Reactivos

- Diclorometano (residuo pesticida o equivalente), (DCM)CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Merck
- n- Hexano (residuo pesticida o equivalente) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

##### 1.7.6.2 Material

Sistema Kuderna-Danish:

Kuderna-Danish (K-D) de 250 ml. Ref. Q-2198. Scharlau.

Columna Snyder. Ref. Q-2196. Scharlau.

Colectores graduados de 10 ml Ref. Q-2197. Scharlau.

Baño de agua

Campana extractora

Boiling chips de teflón

##### 1.7.6.3 Técnica Experimental

Para cada muestra a concentrar tras los procesos de purificación (GPC, Florisil éter etílico-éter petróleo) se debe proceder tal y como sigue.

Añadir una o dos boiling chips al K-D y enroscarle la columna Snyder y el tubo colector. Humedecer la columna Snyder añadiendo 1ml de Diclorometano.

---

Situar el sistema K-D en un baño de agua bajo una campana extractora, de forma que el colector quede sumergido parcialmente en el agua caliente (80 °C) y la superficie redonda del K-D quede bañada de vapor.

En el momento de sumergir agitar un poco para ayudar a que las burbujas de ebullición lleguen hasta la superficie y evitar así “explosiones” de solvente. Durante todo el proceso se debe agitar de vez en cuando el sistema para activar los boiling chips.

Para comprobar la adecuada velocidad de evaporación del solvente se debe comprobar como las piezas de la columna Snyder vibran continuamente pero no flotan sobre solvente condensado.

Una vez en el tubo colector se llega a unos 4 ml de solvente, el sistema K-D se retira del baño y se deja enfriar a T ambiente de forma que así condense el resto de solvente. Una vez frío añadir 1-2 ml de diclorometano al sistema.

Para desconectar el tubo colector y la columna Snyder, secar las juntas con celulosa para evitar que el vapor-agua del baño contamine la muestra.

Se procede a concentrar la muestra bajo corriente de N<sub>2</sub> tal y como se describe en la sección **1.3.5**.

---

### 1.7.7 METODOS DE PURIFICACIÓN. INTRODUCCIÓN

Hay diferentes métodos de purificación que se han empleado en el presente trabajo de investigación, ya que en base a la bibliografía u otras fuentes de información consultadas son los considerados óptimos para la purificación de extractos grasos de pesticidas. Dichos métodos de purificación son:

Florisil 1 (Éter etílico-éter de petróleo)

Florisil 2 (Hexano-acetona) o Florisil Small Columns

Gel Permeation Clean-Up o GPC

Silica

Alumina

Uno de los objetivos del presente trabajo es el desarrollo de un protocolo de trabajo que permitiera el análisis de los pesticidas limitados por la Ecoetiqueta europea, pero por otro lado se ha intentado optimizar en lo que se refiere a:

Tiempo de análisis

Coste de material

Resultados obtenidos

En los presentes apartados se desarrollan los métodos de purificación empleados para comparar su efectividad.



---

### 1.7.8 PURIFICACIÓN FLORISIL 1 (ETER ETÍLICO/ÉTER PETRÓLEO)(--)

Las interferencias que se encuentren junto con los pesticidas a analizar en el extracto graso de la fibra de algodón, se eliminan al pasar dicho extracto por una columna de Florisil, al ir incrementando progresivamente la polaridad del solvente empleado para eluir.

#### 1.7.8.1 **Reactivos**

Éter etílico destilado con un 2% de etanol como conservador. (residuo pesticida o equivalente)Merck .

Éter de petróleo destilado

Sulfato de sodio anhidro granular. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (para análisis) Ref. 131716 Panreac

Florisil (residuo pesticida o equivalente) 60-100 mesh Ref. 3369 J.T. Baker

Eluyentes:

6% (v/v) éter etílico-éter petróleo

15% (v/v) éter etílico-éter petróleo

50% (v/v) éter etílico-éter petróleo

Boiling chips porosidad 20-30

#### 1.7.8.2 **Material**

Columna cromatográfica LC 25mm Øext x 22mm Øint x 300mm. Ref. 64760-U  
Supelco.

Kuderna-Danish (K-D) de 250 ml. Ref. Q-2198. Scharlau.

Columna Snyder. Ref. Q-2196. Scharlau.

Colectores graduados de 10 ml Ref. Q-2197. Scharlau.

---

### 1.7.8.3 Técnica Experimental

#### 1.7.8.3.1 Florisil

El Florisil debe estar activado, caso de no estarlo mantener a 650 °C en una mufla durante una noche.(xiv)

Desactivación del Florisil: para eliminar los ésteres phtálicos después de haber realizado purificaciones de muestras.

Tomar unos 100 g de Florisil en un erlenmeyer de 500 ml y calentar en una estufa a 40 °C durante 16 horas. Transferir a una recipiente de vidrio y dejar enfriar a temperatura ambiente manteniendo bien cerrado el recipiente. Una vez frío añadir 3 ml de agua bidestilada, agitar vigorosamente durante 10 min y dejar durante 2 h como mínimo.

Reactivación de Florisil: para eliminar nitrosaminas, pesticidas OC, OP y PCB's, compuestos nitroaromáticos, haloéteres, hidrocarburos clorados.

Justo antes de emplear activar el Florisil manteniéndolo al menos 16 h a 130 °C en un recipiente de vidrio cubierto con papel de aluminio. Dejar enfriar en un desecador. De tanto en tanto almacenar el Florisil en el horno a dicha temperatura.

La capacidad de absorción del Florisil puede verse modificada en cada uno de estos procesos.

#### 1.7.8.3.2 Protocolo Experimental

Preparar 200 ml de las siguientes mezclas de éter etílico-éter de petróleo para cada una de las muestras que deben purificarse:

6% (v/v) éter etílico-éter petróleo

15% (v/v) éter etílico-éter petróleo

50% (v/v) éter etílico-éter petróleo

---

Preparar la columna de Florisil:

Añadir unos 12 cm de Florisil en la columna LC 25mm Øext x 22mm Øint x 300mm, golpear suavemente de forma que se asiente y quede en unos 10-11 cm.

Añadir unos 2 cm de sulfato de sodio anhidro.

Humedecer la columna con 40-50 ml de éter de petróleo.

Colocar un K-D con el colector roscado para recoger los eluatos o en su caso un erlenmeyer para posteriormente transferir el eluato a un K-D enjuagando 3 veces con éter de petróleo.

Una vez realizados los pasos previos, se procede a transferir la solución a purificar a la columna a una velocidad de unos 5 ml/min. Enjuagar el recipiente que lo contiene y el sulfato de sodio (si lo hubiere) con 3 porciones de 5 ml de éter de petróleo cada una y transferirlas a la columna. Enjuagar las paredes de la columna con pequeñas porciones de éter de petróleo. Añadir los 200 ml de la solución al 6% a una velocidad de unos 5 ml/min (40 min).

Dejar eluir POR GRAVEDAD. No dejar secar NUNCA la columna entre los diferentes eluatos.

Una vez eluída la primera porción al 6% situar otro K-D y añadir los 200 ml de solución al 15% a 5 ml/min (40 min)

Finalmente situar de nuevo otro K-D y añadir los 200 ml de solución al 50% a 5 ml/min (40 min).

**Tabla 5** Eluato en que se recuperan algunos de los pesticidas limitados por la Ecolabel <sup>(xii)</sup>

<b>Pesticida</b>	<b>Recuperación</b>	<b>Fase % éter etílico- éter petróleo</b>
<b>2,4,5-T</b>	R	15
<b>Aldrin</b>	C (100%)	6
<b>Captafol</b>	P(75-80%)	50
<b>Clordano</b>	C (100%)	6
<b>Clordano-cis</b>	C (100%)	6
<b>Clordano-trans</b>	C (100%)	6
<b>o,p'-DDE</b>	C (98%)	6
<b>p,p'-DDE</b>	C (98%)	6
<b>o,p'-DDD</b>	C (99%)	6
<b>p,p'-DDD</b>	C (99%)	6
<b>o,p'-DDT</b>	C (100%)	6
<b>p,p'-DDT</b>	C (100%)	6
<b>Dieldrín</b>	C (100%)	15
<b>Endrín</b>	C (94-96%)	6-15
<b>Heptacloro</b>	C(100%)	6
<b>Hexaclorobenceno</b>	C (100%)	6
<b>Toxafeno</b>	C (96%)	6
<b>Canfecloro</b>		

Clave de códigos

C: recuperación completa (>80%)

R: recuperado pero sin información cuantitativa disponible

P: recuperación parcial (50-80%) indicado el porcentaje.

### 1.7.9 PURIFICACIÓN FLORISIL 2<sup>0</sup>

Gracias a este método de purificación se reducen considerablemente las interferencias de carácter polar que se encuentran en el extracto graso junto con los pesticidas.

El mismo volumen de extracto empleado para este método se mantiene tras la purificación (1-2 ml) con lo cual se reducen considerablemente:

el tiempo de operación

el volumen de solvente empleado

el coste global del análisis

se elimina la fase posterior de concentración

#### 1.7.9.1 **Reactivos**

Acetona (residuo pesticida o equivalente) Merck

n- Hexano (residuo pesticida o equivalente) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

Florisil (residuo pesticida o equivalente) 60-100 mesh Ref. 3369 J.T. Baker

Eluyentes:

10%-90% (v/v) acetona-n-hexano

#### 1.7.9.2 **Material (1)**

Columnas de vidrio 6 ml. Ref. 730172. Chromabond<sup>®</sup>

Sistema de vacío completo para 12 columnas. Ref. 730151. Chromabond<sup>®</sup>

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Teflón

Vasos de precipitados

Embudo

Pipeta aforada 1 ml

Este ha sido el material empleado durante la estancia en el *Southwest Research Institute* (San Antonio Texas EE.UU).

#### **1.7.9.3 Material (2)**

Jeringas de vidrio 5 ml. Ref.Gastigh 1005#. Hamilton

Filtros 13 mm, de 0,45 µm Ref. 6503-06. Lida

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Teflón

Vasos de precipitados

Embudo

Pipeta aforada 1 ml

Este ha sido el material empleado en el Laboratorio de Control de la Contaminación del INTEXTER.

#### **1.7.9.4 Técnica Experimental**

##### **1.7.9.4.1 Florisil**

El Florisil debe estar activado, caso de no estarlo mantener a 650 °C en una mufla durante una noche.(xiv)

Desactivación del Florisil: para eliminar los ésteres phtálicos después de haber realizado purificaciones de muestras.

Tomar unos 100 g de Florisil en un erlenmeyer de 500 ml y calentar en una estufa a 40 °C durante 16 horas. Transferir a un recipiente de vidrio y dejar enfriar a temperatura ambiente manteniendo bien cerrado el recipiente. Una vez frío añadir 3 ml de agua bidestilada, agitar vigorosamente durante 10 min y dejar durante 2 h como mínimo.

Reactivación de Florisil: para eliminar nitrosaminas, pesticidas OC, OP y PCB's, compuestos nitroaromáticos, haloéteres, hidrocarburos clorados.

Justo antes de emplear, activar el Florisil manteniéndolo al menos 16 h a 130 °C en un recipiente de vidrio cubierto con papel de aluminio. Dejar enfriar en un desecador. De tanto en tanto almacenar el Florisil en el horno a dicha temperatura.

La capacidad de absorción del Florisil puede verse modificada en cada uno de estos procesos.

#### **1.7.9.4.2 Protocolo Experimental**

Preparar unos 25 ml de acetona-n-hexano 10%-90% (v/v) por muestra a purificar.

En el caso de disponer del material citado en el apartado **1.3.9.2** se procede de la siguiente forma: se debe conectar el sistema de vacío Chromabond ® a una bomba de aspiración o una trompa de vacío, conectando una trampa intermedia. Ajustar la presión de vacío.

Poner un poco de Teflón en las puntas de las jeringas de 6 ml de forma que ajusten bien al sistema de vacío y así facilitemos el proceso de elución.

Tomar Florisil en un vaso de precipitados y verter en un embudo a la columna hasta una altura de 1,5 cm aproximadamente (golpeando suavemente de forma que el Florisil se asiente).

Este sistema se puede sustituir por puntas de pipetas, jeringas, etc. y sin conexión a vacío dejando que las muestras eluyan por gravedad, para ello se emplea el material descrito en la sección **1.3.9.3**, con lo cual se minimiza el coste, aunque si las muestras son muy sucias aumenta el tiempo de operación.

Añadir unos 10 ml de la mezcla acetona-n-hexano para humedecer el Florisil. Dejar eluir POR GRAVEDAD (sea cual sea el material disponible). No dejar secar NUNCA la columna entre los diferentes eluatos. Recoger esta porción de mezcla en un erlenmeyer o vaso de precipitados para residuo.

Enjuagar la punta de las jeringas con n-hexano y cambiar el recipiente colector de residuo por un vial de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE.

Transferir cuantitativamente (jeringa, pipeta aforada) un volumen de muestra a purificar que debe ser IGUAL al volumen final necesario para el análisis (1-2ml)

Eluir los pesticidas del extracto a través de la columna de Florisil, añadiendo porciones de la mezcla acetona- n-hexano hasta recoger unos 9 ml en el vial de 12 ml.

Ajustar a volumen final mediante N<sub>2</sub>.



#### 1.7.10 PURIFICACIÓN GEL PERMEATION CLEAN-UP (GPC)(-)

Gel Permeation Clean-Up o GPC es un método de purificación por exclusión de tamaño de los diferentes componentes de un extracto, los cuales eluyen a través de una volumen que contiene un gel poroso que se caracteriza por la uniformidad del tamaño de poro.

En el caso de extractos de muestras conteniendo pesticidas organoclorados el solvente empleado es el diclorometano.

##### 1.7.10.1 Reactivos

Diclorometano (residuo pesticida o equivalente).(DCM)CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> Merck

Mezcla calibración GPC:

. *Aceite de maiz*, 125 mg

. *Dietileftalato* 5 mg

. *Metoxicloro* 1mg

. *Perileno* 0,1 mg

. *Sulfuro* 0.4 mg

##### 1.7.10.2 Material

Inyector Water 712 Wisp automatizado. Loop 5 ml

Sistema GPC Jordi automatizado

Bio-beds SX3

Detector UV ISCO TYPE 6 OPTICAL UNIT

Jeringas de vidrio 10 ml. Ref.Gastigh 1005#. Hamilton

Filtros 13 mm, de 0,45 µm Ref. 6503-06. Lida

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Teflón

Erlenmeyers 250 ml

Este ha sido el material empleado durante la estancia en el Southwest Research Institute (San Antonio, Texas, EEUU)

### **1.7.10.3 Técnica Experimental**

#### **1.7.10.3.1 Consideraciones generales**

Es muy importante mantener una temperatura constante en el laboratorio durante todo el proceso de purificación, que puede durar 24 h o más si el sistema empleado está automatizado. En el caso de que haya variaciones de temperatura los tiempos de elución pueden modificarse y por tanto las fracciones colectadas correspondientes a residuo o muestra pueden ser incorrectas. La temperatura recomendada es de 22 °C para evitar la evaporación del DCM.

Para evitar la saturación de la columna de GPC, se recomienda la dilución de los extractos muy viscosos.

Dado que las partículas con diámetro superior a 0,5 µm podrían afectar la válvula del inyector, hecho que podría comportar un fallo del sistema o la contaminación de los extractos en el loop de dicho inyector, se recomienda el filtrado de los extractos a través de un filtro de disco de 0,45 µm. Se debe tomar 10 ml del extracto a purificar con la jeringa, conectar el filtro de disco en su punta y forzar el paso del extracto a través de dicho filtro, colectando el extracto ya filtrado en un vial de 12 ml de tapón de rosca y junta de teflón.

#### **1.7.10.3.2 Calibración del sistema GPC**

La calibración del sistema GPC está basada en la monitorización de los tiempos de elución de una mezcla estándar de calibración, mediante un detector de UV conectado a la columna GPC y se debe realizar siempre que se cambie la columna, se detecte algún fallo en el sistema o se ponga en marcha el sistema. El proceso de calibración es el que sigue:

Se debe verificar el caudal de DCM a través del sistema, controlando el volumen eluido en 10 minutos, que debería ser de unos 45-55 ml correspondientes a un caudal entre 4,5-5,5 ml/min.

Anotar la P de la columna, la cual debe situarse entre 6-10 Psi.

Anotar la T de laboratorio.

Ajustar el detector de UV a una longitud de onda de 254 nm.

Situarse en el sistema de purificación un vial con un mínimo de 8 ml de la mezcla estándar de calibración para GPC, volumen necesario para el loop empleado, el cual es de 5 ml.

Determinar los tiempos de elución del *Ftalato*, *Metoxicloro* y *Perileno*.

Considerar período de elución de residuo ( $\Delta tr$ ), desde la inyección de la muestra en el sistema ( $t_0$ ) hasta el correspondiente a un 85% de elución del *Ftalato* ( $t_1$ ).

Considerar como período de elución de los pesticidas ( $\Delta tp$ ) entre el tiempo correspondiente a un 95% de elución del *Metoxicloro* ( $t_2$ ) y el tiempo justo inmediato a la elución del *Sulfuro* ( $t_3$ )

Considerar un período de limpieza del sistema de 10 min ( $\Delta tl$ ).

Reinyectar la mezcla de calibración tantas veces como sea necesario hasta determinar claramente los tiempos de elución ya referidos.

**Tabla 6** Tiempos de operación del GPC

<b>Tiempo (t)</b>	<b>Correspondencia</b>
0	Inicio proceso GPC
1	85% elución <i>Ftalato</i>
2	95% elución <i>Metoxicloro</i>

<b>Período (<math>\Delta t</math>)</b>	<b>Correspondencia</b>
$\Delta tr$	Residuo
$\Delta tp$	Analitos
$\Delta tl$	Limpieza

### 1.7.10.3.3 Protocolo experimental

Situar los viales con los extractos filtrados y convenientemente rotulados en el sistema de inyección automático GPC.

Revisar los valores de presión del sistema (6-10 Psi.)

Comprobar que el caudal de DCM en el sistema es de unos 4,5-5,5 ml/min.

Colocar erlenmeyers de 250 ml para colectar los extractos purificados.

Iniciar la secuencia automatizada de purificación GPC, en la cual ya se tienen en cuenta los tiempos de elución de residuo o de pesticidas (determinados previamente en la calibración del sistema), además de existir un sistema automatizado de limpieza del inyector y de su loop entre muestra y muestra.

De cada extracto se inyectan 8 ml para un loop de 5 ml.

Una vez colectados los diferentes extractos tapar con papel de aluminio los erlenmeyeres para minimizar la evaporación de DCM.

Proceder a concentrar el exceso de solvente por el sistema Kuderna-Danish en primer lugar (Ver sección **6.3.6**).

Finalizar la concentración de DCM y el cambio de solvente a n-hexano o isooctano mediante nitrógeno (Ver sección **6.3.5**).

#### 1.7.11 PURIFICACIÓN SILICA <sup>(1)</sup>

La Silica es un material adsorbente generado por reacción de silicato de sodio y ácido sulfúrico, aunque se puede adquirir comercialmente.

Este sistema de purificación se recomienda para los hidrocarburos polinucleares aromáticos, como es el caso de gran parte de los pesticidas limitados por la Ecolabel así como para fenoles una vez derivatizados (pentaclorofenol y 2,4,5-T)

##### 1.7.11.1 Reactivos

Acetona (residuo pesticida o equivalente) Merck

n- Hexano (residuo pesticida o equivalente) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

Silica (residuo pesticida o equivalente) 60-100 mesh Ref. 3369 J.T. Baker

Eluyentes:

10%-90% (v/v) acetona-n-hexano

##### 1.7.11.2 Material

Jeringas de vidrio 5 ml. Ref.Gastigh 1005#. Hamilton

Filtros 13 mm, de 0,45 µm Ref. 6503-06. Lida

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Teflón

Vasos de precipitados

Embudo

Pipeta aforada 1 ml

##### 1.7.11.3 Técnica Experimental

###### 1.7.11.3.1 Silica

Activación de Silica: para eliminar los hidrocarburos clorados, pesticidas etc. Mantener a 150-160° durante unas 16 h.

Justo antes de emplear la Silica mantener durante unas 16 h a 130 °C en un recipiente de vidrio cubierto con papel de aluminio. Dejar enfriar en un desecador. De tanto en tanto almacenar la Silica en la mufla a dicha temperatura.

#### **1.7.11.3.2 Protocolo Experimental**

El protocolo experimental es idéntico al referido en la Sección 1.3.9.4.2

#### 1.7.12 PURIFICACIÓN ALUMINA <sup>0</sup>

La Alumina consiste en unos gránulos de óxido de aluminio altamente porosos que se emplea en cromatografía para separar los analitos de posibles interferencias en base a su diferente polaridad química. Está disponible en tres rangos de pH (ácido, neutro y básico).

En la purificación de pesticidas se estimó conveniente emplear la forma neutra, al ser la recomendada por la EPA.

##### **1.7.12.1 Reactivos**

Acetona (residuo pesticida o equivalente) Merck

n- Hexano (residuo pesticida o equivalente) C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck

Alumina (residuo pesticida o equivalente) 60-100 mesh Ref. 3369 J.T. Baker

Eluyentes:

10%-90% (v/v) acetona-n-hexano

##### **1.7.12.2 Material**

Jeringas de vidrio 5 ml. Ref.Gastigh 1005#. Hamilton

Filtros 13 mm, de 0,45 µm Ref. 6503-06. Lida

Viales de 12 ml con tapón de rosca y junta de PTFE Supelco. Ref. 2-7161

Teflón

Vasos de precipitados

Embudo

Pipeta aforada 1 ml

##### **1.7.12.3 Técnica Experimental**

El protocolo experimental es idéntico al referido en la Sección 1.3.9.4.2

## 1.8 TÉCNICAS ANÁLISIS.

### 1.8.1 INTRODUCCIÓN <sup>0</sup>

El objetivo de estos apartados es el de dar una rápida visión de los dos métodos de análisis de muestras empleadas en el presente trabajo:

Cromatografía de Gases-Detector de Captura de electrones (GC-ECD).

Cromatografía de Gases- Espectrometría de Masas (GC-MS)

La cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD) es una técnica que permite la separación de mezclas complejas, pero una vez separados, detectados e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una mezcla problema, el único dato del que se dispone para la identificación de cada uno de ellos es el *tiempo de retención*. Este dato NO es suficiente para una identificación inequívoca por lo que en caso de emplearse esta técnica y detectarse analitos se debe proceder a una confirmación mediante (GC-MS)

La cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) permite la separación, detección, cuantificación e identificación de forma casi inequívoca de sustancias puras.

#### 1.8.1.1 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)

##### 1.8.1.1.1 Características

La espectrometría de masas es, sin duda, la técnica analítica instrumental más completa que existe hoy día, entre sus cualidades cabe citar:

Capacidad de identificación: puede identificar cualitativamente y de forma inequívoca casi cualquier tipo de sustancia, ya que proporciona un espectro de masas que es algo así como la "huella digital" de una sustancia.

Es cuantitativa: permite no sólo la identificación sino la cuantificación de las sustancias determinadas.



Permite el análisis de mezclas complejas, permitiendo el análisis simultáneo de sustancias con composición similar.

Posee una gran sensibilidad: según el sistema se pueden detectar hasta el orden de ppq (partes por cuatrillón en la técnica ICP-MS).

Es universal y específica: es decir puede analizar sustancias puras o mezclas de sustancias sólidas, líquidas o gaseosas y también es capaz de aislar una sustancia concreta en una matriz compleja.

Es una técnica rápida, pudiendo proporcionar espectros en décimas de segundo, por lo que se puede emplear para monitorización de procesos, suministrando información en tiempo real.

Puede proporcionar información estructural de la molécula analizada.

Proporciona información isotópica, pudiéndose aplicar para estudios de isótopos estables o radiactivos.

#### **1.8.1.1.2 Descripción del proceso**

Supongamos que una mezcla es inyectada en el cromatógrafo de gases, gracias a su diferente volatilidad y a su diferente interacción con la columna capilar, los diferentes componentes de la mezcla eluyen a través de la columna a diferente velocidad, por lo que pasan al espectrómetro de masas individualmente.

La muestra en forma gaseosa que proviene del GC se introduce en la fuente de ionización a través de la interfase la cual se encuentra entre 150-300 °C para prevenir condensaciones, logrando con este sistema pasar de una presión atmosférica a la salida de la columna capilar al nivel de vacío existente en la cámara de ionización. Las moléculas de nuestra muestra al pasar a la cámara de ionización, se encontrarán con una corriente de electrones procedentes de un filamento incandescente de tungsteno. Realmente lo que tiene lugar en la cámara de ionización es una interacción: electrones (e<sup>-</sup>)⇒átomos, ya que debido a las dimensiones relativas de los e<sup>-</sup> respecto los átomos no se puede hablar de un verdadero choque o impacto.

Los electrones son acelerados al existir una diferencia de potencial entre el filamento y la cámara de ionización, mientras unos pequeños imanes se emplean para conseguir que la trayectoria de los e<sup>-</sup> desde el filamento hasta el ánodo tenga forma de espiral aumentando así su recorrido y la probabilidad de colisión con las moléculas del analito en cuestión.

Por otro lado, una placa repulsora, de potencial positivo (el “repeller”) se encarga de expulsar los iones positivos formados en la fuente, que a través de una rendija pasan a la zona de aceleración. Estos valores pueden ser controlados por lo que su optimización asegura que el máximo número de iones es expulsado de la cámara de ionización y enfocados hacia la entrada del cuadrupolo.

La corriente de iones al chocar contra el primer dínodo provocan la emisión de un elevado número de electrones, los cuales inciden sobre una placa cubierta por una lámina de fósforo, produciéndose fotones de luz que son detectados a su vez por el fotomultiplicador. En el fotomultiplicador los fotones se convierten de nuevo en electrones y esta corriente amplificada es la señal del detector.

La señal generada produce un pico gaussiano, cuya altura será proporcional a la concentración máxima alcanzada y cuya área será una medida proporcional de la cantidad total de compuesto detectado.

#### **1.8.1.2 Cromatografía de Gases-Detector Captura Electrones (GC-ECD)**

##### **1.8.1.2.1 Características**

El ECD es el detector más sensible disponible para el análisis de compuestos electrofílicos, como los hidrocarburos clorados que se encuentran en los residuos de pesticidas.

Es un detector cuantitativo

Es un detector no destructivo de la muestra.

#### 1.8.1.2.2 Descripción del proceso

La celda del ECD contiene un cilindro a través del cual fluye la muestra arrastrada por el gas portador. La superficie interna de dicho cilindro está recubierta de Ni63 el cual tiene una sensibilidad nominal de 15 milicuries (es radiactivo).

Para optimizar la respuesta del detector se combina el efluente de la columna capilar con otra fuente de gas, el llamado make-up.

Las partículas  $\beta$  emitidas desde el isótopo Ni63 ionizan el gas portador. Los iones resultantes y los electrones llegan hasta el ánodo colector, bajo la influencia de una diferencia de potencial entre la fuente y el colector.

La frecuencia se modifica automáticamente para mantener constante la corriente que sale desde el detector. La presencia de especies que absorben electrones para formar iones en el detector disminuye la corriente, al viajar mucho más lentamente los iones que los electrones. Son estas variaciones de frecuencia las que se emplean como señal de salida del detector y que indican la presencia o no de analitos electrófilos.

El gas portador debe ser N<sub>2</sub> o una mezcla 95% argón-5% metano. Utilizando columnas capilares se utiliza un flujo de 5 ml/min o inferior de He o H<sub>2</sub> se utiliza como gas portador, utilizándose N<sub>2</sub> o argón-metano como gas complementario, siendo el flujo total de unos 30 ml/min o más.

---

## 1.8.2 ANÁLISIS CROMATOGRAFÍA GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS (GC-MS) <sup>(64-65-66-67-25-42)</sup>

Este procedimiento define el método para la determinación de pesticidas, herbicidas ácidos y fenoles mediante GC-MS. Es un método limitado a aquellos analitos para los que el análisis por GC-MS ha sido validado. Los procedimientos concretos de extracción, derivatización y purificación que deben emplearse en cada muestra deben ser definidos por el responsable del análisis.

### 1.8.2.1 **Reactivos**

n-Hexano (residuo pesticida o equivalente), C<sub>6</sub>H<sub>6</sub> Merck  
patrones pesticidas puros certificados (Ver sección 6.1)

#### 1.8.2.1.1 **Preparación de estándares**

Todos los pesticidas adquiridos deben ser certificados siempre que sea posible, manteniéndose dichos certificados en el laboratorio en que debe realizarse el análisis.

*Estándar stock:* para cada pesticida debe prepararse una solución a 1-2 mg/ml (la precisión de la balanza debería ser de  $\pm 0,0001$ g).

Cada estándar debe etiquetarse con el nombre del analito, la concentración y fecha de preparación. Se debe considerar un año de validez de cada *estándar stock*, a contar desde la fecha de su preparación.

*Estándar interno:* el *estándar interno* empleado es una solución comercial de 1,2-Diclorobenceno-d<sub>4</sub>, Naftaleno-d<sub>8</sub>, Acenafteno-d<sub>10</sub>, Criseno-d<sub>12</sub> y Perileno-d<sub>12</sub> en diclorometano, con una concentración de 4 mg/ml. Se prepara una solución estándar interno de forma que cada estándar esté presente a una concentración aproximada de 10 ng/ $\mu$ l.

---

Estándar stock mezcla: se prepara una mezcla de pesticidas, empleando n-hexano como solvente de forma que cada pesticida esté presente a una concentración entre 10-40 ng/μl. Cada estándar debe etiquetarse con el nombre del analito, la concentración y fecha de preparación. Se deben considerar seis meses de validez de cada estándar stock, a contar desde la fecha de su preparación, salvo en aquellos casos en que se pruebe que ha de ser inferior.

Estándares de calibración: mediante diluciones en serie a partir del estándar stock mezcla y empleando n-hexano como solvente, se deben preparar cinco estándares de diferentes concentraciones entre 0,005-0,1 ng/μl. Dichas diluciones se emplearán como estándares de calibración.

A cada estándar de calibración se debe añadir el volumen correspondiente de estándar interno de forma que la concentración de cada analito del estándar interno sea en TODAS los estándares de calibración de 0,1 ng/μl.

### **1.8.2.2 Material**

VG Fisons MD800 GC/MS equipado con software para adquisición y análisis de datos (programa Mass.lab).

Columna DB-5MS J&W Scientific 30m x 0,25 mm x 0,25 μm o columna equivalente.

#### **1.8.2.2.1 Preparación del equipo GC**

Si la columna instalada no es la correcta se debe proceder como sigue:

Situar un septum nuevo y extraer el inyector splitless y limpiar con mezcla crómica y acetona. En caso de que el inyector previamente instalado sea el split, cambiar por el splitless. Este procedimiento se debe seguir siempre que se cambie de columna o si se observan los picos de los cromatogramas con cola.

Conectar la nueva columna de forma que unos 2 mm se inserten en la cámara de ionización del MS. El otro extremo se inserta unos 64 mm en el inyector splitless. Consultar el manual MD800 <sup>(62)</sup>.

Situar las condiciones de operación en el programa Mass.lab. Considerar que el analista puede modificar la rampa de T del GC para optimizar la separación de los diferentes analitos en los cromatogramas. Ver Tabla 7.

**Tabla 7 Condiciones del GC y del inyector**

T inyector (°C)	Rampa de T del GC-MS		
	Tiempo (min)	Temp (°C)	Rampa (°C/min)
200	3,00	160	5,00
	3,00	200	5,00
	0,00	270	

Valvula purga (s)	Válvula split (s)
45	45

#### 1.8.2.2.2 Preparación del equipo MS

El MS debe ajustarse mediante el software disponible (TUNE), implementando los valores que se indican en la Tabla 8. Ver ANEXO 5

Las condiciones óptimas obtenidas finalmente para el análisis de los pesticidas limitados por la Ecolabel son:

Tabla 8 Condiciones del MS

PARÁMETRO	VALORES
Temperatura de la fuente	200 °C
Energía de los electrones	70 eV
Corriente emisión	100-200 $\mu\text{A}$ (recomendado 100)
Tipo de barrido	Full-Scan o SIM
Ionización	EI+
Retraso por elución del solvente (min)	2,25

### 1.8.2.3 Técnica Experimental

#### 1.8.2.3.1 Modo Full-Scan

Para determinar el orden de elución de los diferentes analitos y optimizar las condiciones del GC se debe proceder tal y como sigue:

Indicar en el programa Mass.lab las condiciones de T del GC y las del MS, el cual trabajará en Full-Scan para realizar un barrido completo de todos los iones de los diferentes analitos

Inyectar 2-3  $\mu\text{l}$  de la mezcla de analitos junto con los estándares internos a una concentración aproximadamente de 1 ng/ $\mu\text{l}$ .

Una vez obtenido el cromatograma completo, determinar los tiempos de retención de cada analito, comprobar la correcta elución y comparar los espectros de los analitos inyectados con los presentes en las librerías instaladas en el software del programa (LIBXT, NIST).

**1.8.2.3.2 Modo Selected Ion Monitoring (SIM)**

En base al cromatograma obtenido en la sección **1.4.2.3.1** ordenar los analitos en grupos:

El número de analitos en cada grupo depende de la sensibilidad requerida. A mayor sensibilidad necesaria menor número de iones a monitorizar que se pueden incluir por grupo.

Una buena sensibilidad se obtiene cuando en cada grupo hay entre 4-6 analitos (ente pesticidas y estándar interno).

Examinar los grupos para asegurar que los tiempos de retención de cada grupo no se superponen o que algún analito eluye en el tiempo en blanco entre grupo y grupo(Ver Tabla 28).

Para cada analito se escogen dos iones para monitorizar. Generalmente uno de ellos es el que aparece como mayoritario en el espectro. Para el caso de los pesticidas organoclorados se suelen escoger pares isotópicos de iones (M y M+2) en los que la variación de la masa depende de la presencia de Cl35 o Cl37.

Los iones recomendados para los pesticidas limitados por la Ecolabel y para el estándar interno empleado son los que siguen.



**Tabla 9 Iones primario y secundario de los pesticidas limitados por la Ecolabel y de los estándares internos.**

	PESTICIDA	Ion 1 Cuantificación	Ion 2	TIEMPO ANÁLISIS (min)	Grupos
	Hexaclorobenceno	284	179	7,50-11,50	<b>1.1</b>
	Fenantreno-d10	188	94		
<b>1</b>	Heptacloro	100	272	13,10-13,80	<b>1.2</b>
	Aldrín	263(66)	261		
	Clordano (1)	373	375	16,20-17,80	<b>1.3</b>
	Clordano (2)	373	375		
	Clordano (3)	373	375		
	o,p´-DDE	246	248		
	p,p´-DDE	246	248	18,10-19,80	<b>2.1</b>
	Dieldrín	263(79)	265		
	o,p´-DDD	235	237		
	Endrín	263	265 (81)		
	p,p´-DDD	235	237	20,10-21,00	<b>2.2</b>
<b>2</b>	o,p´-DDT	235	237		
	Endrín aldehído	345	250 (67)		
	p,p´-DDT	235	237	21,80-25,00	<b>2.3</b>
	Captafol	79	77		
	Endrín Cetona	317	319 (67)		
	Criseno-d12	240	120		

Bloque 1: método cuantificación ECOL1.MTH / patrón interno *Fenantreno d-10*

Bloque 2: método cuantificación ECOL2.MTH / patrón interno *Criseno d-12*

El “dwell time” (tiempo de scan de cada ión) se debe seleccionar para cada grupo de forma que la suma de los tiempos de scan de todos los analitos del grupo más el

---

“interchannel delay” (tiempo entre la monitorización de cada ion) suma 1.0 s aproximadamente.

### 1.8.2.3.3 Protocolo de muestras

Una vez determinadas las condiciones óptimas de elución de los analitos (rampa de T) y conocidos los tiempos de elución de los diferentes pesticidas mediante una serie de inyecciones en modo Full Scan, se procede como sigue:

Se deben establecer las rectas de calibración para cada uno de los pesticidas. Si el GC-MS ya ha sido calibrado previamente solo requiere una verificación de la adecuación de las rectas de calibrado (ver apartado **1.4.2.3.4**). Si se supera el límite de aceptación de las rectas de calibrado se debe recalibrar empleando cinco concentraciones estándar.

El orden de inyección de las muestras es el que sigue:

**Fig. 2 Orden de inyección de muestras en el GC-MS**

Blanco de solvente
Estándar 1 de calibración (menor concentración)
Estándar 2 de calibración
Estándar 3 de calibración
Estándar 4 de calibración
Estándar 5 de calibración (mayor concentración)
Blanco de solvente
Estándar 3 de calibración (verificación)
Blanco de la extracción
Matrix spike de la muestra (si es posible)
Duplicado de Matrix Spike
Extractos de muestra (15 como máximo)
Blanco de solvente
Estándar 3 de calibración (verificación)

#### 1.8.2.3.4 Calibración del instrumento

El criterio para aceptar o rechazar una recta de calibrado viene determinado por el %RSD (% desviación estándar relativa) de cada uno de los analitos, este debe ser inferior o igual a un 30% (siempre que sea posible)(64)

#### Ec. 3 Factor de respuesta relativo

- . **RF**: factor de respuesta relativo correspondiente al analito
- . **Ai**: área integrada del cromatograma correspondiente al ion primario o cuantitativo del pesticida objeto de análisis.
- . **Ais**: área integrada del cromatograma correspondiente al ion primario o cuantitativo del estándar interno.
- . **Ci**: concentración del analito estándar de calibración.
- . Cis: concentración del estándar interno

Tan pronto como sea posible tras haber completado la secuencia de muestras, se deben calcular los RF (Factores de respuesta relativos) para cada uno de los analitos presentes en los estándares de calibración, para ello se procede como sigue:

- . Se genera el cromatograma correspondiente al ion primario o de cuantificación para cada analito.
- . Se genera la recta de calibración para cada uno de los pesticidas (RF vs Concentración) mediante el programa de software Mass.lab incorporado al GC.MS <sup>(63)</sup>.

Para cada uno de los pesticidas analizados se calculan entre otros, los siguientes parámetros:

- . **RTm**= tiempo de retención promedio
- . **RRTm=tiempo** de retención relativo promedio
- . **RFm=factor** de respuesta relativo promedio

- 
- . **%RSD**= porcentaje de la desviación relativa estándar.
  - . **% REC=porcentaje** de recuperación del analito

Las ecuaciones empleadas para el cálculo de cada uno de los parámetros son la que siguen:

**Ec. 4      Tiempo de retención promedio**

- . **RTm**: tiempo de retención promedio del analito
- . **RTi** : tiempo de retención absoluto del analito
- . **n**: número de medidas

Para cada analito se genera una “ventana” de detección de los iones primario y secundario,  $RTm \pm 0,5$  s, dado que pueden haber pequeñas variaciones de los RT a lo largo de todos los análisis.

**Ec. 5      Tiempo de retención relativo promedio**

- . **RRTm**: tiempo de retención relativo promedio del analito
- . **RTi** : tiempo de retención absoluto del analito
- . **RTsi**: tiempo de retención absoluto del estándar interno
- . **n**: número de medidas

---

**Ec. 6 Factor de respuesta relativo promedio**

- . *RF<sub>m</sub>* : factor de respuesta relativo promedio
- . *RF*: factor de respuesta relativo
- . *n*: número de medidas

**Ec. 7 % de desviación relativa estándar de los factores de respuesta**


Ecuación en la que es necesario calcular ***SDRF***

**Ec. 8 Desviación relativa de los factores de respuesta**

- . ***%RSD***: porcentaje de desviación relativa estándar
- . ***SDRF***: desviación estándar de los factores de respuesta
- . ***RF<sub>i</sub>***: factor de respuesta relativo
- . ***RF<sub>m</sub>***: factor de respuesta relativo promedio

Las rectas de calibración se pueden considerar satisfactorias cuando el **%RSD** de cada uno de los analitos sea inferior o igual a un 30%.

**Fig. 3 Criterio de aceptación de las rectas de calibración para cada analito**


$$\%RSD \leq 30\%$$

Si alguno de los analitos presenta una calibración fuera del rango de aceptación (%RSD superior a un 30%) se puede intentar repetir alguno de los estándares de calibración para intentar solventar el problema, en caso contrario se debe repetir todo el proceso de calibración (Ver Fig. 2).

**Ec. 9      % Recuperación de cada pesticida**

- . **%REC:** porcentaje de recuperación de cada analito
- . **Cnom:** concentración inicial de analito (inyectada en los patrones)
- . **Ccalc:** concentración calculada de recuperación

---

#### 1.8.2.3.5 Cuantificación de muestras

Una vez establecidas las rectas de calibración tal y como se indica en el punto 1.4.2.3.4, es posible proceder a la cuantificación de los extractos procedentes de muestras.

Cada muestra es inyectada siguiendo el orden establecido en la Fig. 2.

Se procede a escanear cada cromatograma buscando los iones primarios o de cuantificación de cada uno de los pesticidas prohibidos por la Ecoetiqueta europea, para ello se tendrá en cuenta el RRT (tiempo de retención relativo).

Si en una muestra se observa la presencia de algún analito al detectarse el ion primario en el RRT correspondiente, se procede a confirmar buscando el ion secundario o de confirmación en el mismo RRT.

Si para un analito determinado se detectan tanto el ion primario como el secundario en el tiempo de retención relativo de los patrones,  $RRT \pm 0,50$  s, se procede a la cuantificación de la muestra con la siguiente ecuación:

Ec. 10.



- 
- <sup>i</sup> (1988) **Hsu J.P, Lewis R. B. et al.** Analytical methods for detection of nonoccupational exposure to pesticides. *Journal of Chromatographic Science*. **26**, 181-189.
- <sup>ii</sup> (1997) **Geene R.V y Wimbush J.M.** The extraction for chemical analysis of pesticide residues in wool and wool products. *IWS*.
- <sup>iii</sup> (1987) **Steinwandter H.** Contributions to residue analysis in soils. I. Comments on pesticide extraction. *Fresenius A Anal. Chem.*, **327**, 309-311.
- <sup>iv</sup> (1992) Analytical Methods for Pesticides/Aroclors Exhibit D Section 10, Procedure-Sample Preparation. **D-39** Pest. Percent Moisture
- <sup>v</sup> (1986) **Method 3541** Automated Soxhlet Extraction. *Test Methods for Evaluating Solid waste. (1986). Volume 1b: Laboratory manual physical/chemical methods.* EPA..
- <sup>vi</sup> (1986) **Miellet A.** Nouvelles Méthodes d'extraction de résidues de pesticides dans le végétaux a l'aide d'un Soxtec. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **849**, 79.245-248.
- <sup>vii</sup> (1995) **Lázaro R y col.** Comparación de dos técnicas de extracción de materia grasa para la determinación de residuos organoclorados en alimentos. *Grasas y aceites*. **48**, 1. 35-38.
- <sup>viii</sup> Methode de determination de l'extratit dichlormethanique dans le ruban de laine peignne. *IWTO 10-66*. Norme adoptée par la Commission Technique de la Fédération Lainière Internationale
- <sup>ix</sup> (1986) **Method 3540.** Soxhlet Extraction. *Volume 1b: Laboratory manual physical/chemical methods.* EPA.
- <sup>x</sup> (1990) ASTM Method D 3086 Nitrogen Evaporation Technique.
- <sup>xi</sup> (1992) Analytical Methods for Pesticides/Aroclors Exhibit D Section 10, Procedure-Concentrating the extract. **D-40** Concentration by K-D. D-40,D-41.
- <sup>xii</sup> (1994) Florisil column cleanup, with three ethyl ether/petroleum ether eluants. *Pesticide Analytical Manual. Vol I.* Section 303.11.

- 
- <sup>xiii</sup> (1963) **Mills P.A.** *J. Assoc. Off. Agric. Chem.* **46**, 186-191.
- <sup>xiv</sup> (1986) **Method 3620.** Florisil column cleanup. Test Methods Evaluating Solid waste. Volume Ib: Laboratory manual physical/chemical methods. EPA.
- <sup>xv</sup> (1992) Analytical Methods for Pesticides/Aroclors Exhibit D Section 10, Procedure-Cleanup Procedures. **D-39** Pest. Florisil Cleanuo. D-53,D-55.
- <sup>xvi</sup> (1992) Analytical Methods for Pesticides/Aroclors Exhibit D Section 10, Procedure-Cleanup procedures. **D-43.** Sample Cleanup by Gel Permeation Chromatography (GPC). D-43,D-53.
- <sup>xvii</sup> (1993) **Armishw et al.** Comparison of Gel permetation chromatography, sweepe codistillation, and Florisil column adsorption chromatography as sample cleanup tecniques for the determination of organochlorine pesticide residues in Animal fats. *Journal of AOAC International.* **76**, 6, 1317-1322.
- <sup>xviii</sup> (1986) **Method 3630.** Silica Gel cleanup. Test Methods Evaluating Solid waste. Volume Ib: Laboratory manual physical/chemical methods. EPA.
- <sup>xix</sup> (1986) **Method 3610.** Alumina Column cleanup. Test Methods Evaluating Solid waste. Volume Ib: Laboratory manual physical/chemical methods. EPA.
- <sup>xx</sup> (1993) **Esteban, L:** *La espectrometría de masas en imágenes.* ACK .
- <sup>xxi</sup> (1992) Analytical Methods for Pesticides/Aroclors Exhibit D Section 9, GC Operating Conditions/Initial Calibration. D22-D34.
- <sup>xxii</sup> (1995) **Bhattacharyya N. et al.** Analysis of PCP, chlorinated compounds and heavy metals in trace level. *Journal of textile asociation.* 253-260.
- <sup>xxiii</sup> (1986) **Method 8081** Organochlorine pesticides and PCBs:Capillary Column Technique. *Test Methods for Evaluating Solid waste. Volume Ib: Laboratory manual physical/chemical methods.* EPA.
- <sup>xxiv</sup> (1994) **Parveen Z. et al.** A multi-residue method for quantitation of organochlorine, organophosphorus and synthetic pyrethorid pesticides in cotton seeds. *Pakistan journal science industrial research.* **37**, 12, 536-540.

---

<sup>xxv</sup> (1990) **Grob R.** Modern Practice of Gas Chromatography Second Edition. Robert L. Grob Department of Chemistry Villanova University. *Ed. John Wiley & sons.*

<sup>xxvi</sup> (1985) **Schomburg G.** Gas Chromatography. A practical Course *Ed. VCH*