

Anexo 1. Protocolo de adsorción de lindano

Reactivos

- Lindano (γ -HCH).
- Agua destilada.
- Adsorbentes.
 - Grafito expandido por microondas (MO).
 - Grafito expandido térmicamente a 500°C (G 500).
 - Grafito expandido térmicamente a 900°C (G 900).
- Soluciones tampón para la modificación del pH:
 - Tampón de pH 3.
 - Tampón de pH 5.
 - Tampón de pH 9.

Materiales

- Vasos de precipitados de 100 mL.
- Parafilm.
- Filtros.
- Embudo para filtración.
- Matraz de filtración Erlenmeyer de vidrio con conexión de manguera.

Equipos

- Micropipetas. Un juego de 2 micropipetas (1000, 100 μ L).
- Baño de ultrasonidos.
- Balanza analítica.
- pH-metro.
- Agitadores magnéticos.
- Placas calefactoras con agitación.
- Bomba de vacío.

Procedimiento

Disolución madre de lindano

La solubilidad del lindano en agua es de 7,3 mg/L a 25 °C (Richardson & Miller, 1960), mientras que a 35 °C aumenta hasta 11,4 mg/L (Biggar & Riggs, 1974).

Se prepara una **disolución madre (DM)** de 5 mg/L (= 5 ppm) aproximadamente de lindano en agua destilada a 35 °C. Para conseguir más exactitud, la DM se prepara en peso, calculando las concentraciones reales a partir del peso de los volúmenes añadidos.

1. Pesar en balanza analítica una determinada cantidad de lindano (5 mg) en función del volumen a preparar (1 L).
2. Trasvasar el lindano a un matraz aforado junto con agua destilada estéril a 35 °C hasta el enrase y colocar en el baño de ultrasonidos durante 30 minutos para la completa disolución del soluto.
3. Dejar enfriar a temperatura ambiente y volver a enrasar con agua destilada estéril, ya que como antes se enrasó a 35 °C el volumen disminuye al enfriarse.
4. Conservar en el matraz aforado. Guardar donde no tenga exposición directa a la luz hasta su uso.
5. Cuando se vaya a utilizar, colocar en el baño de ultrasonidos durante 30 minutos para asegurar que todo el lindano se encuentra disuelto.

Disoluciones iniciales de lindano

Se preparan con un volumen de 50 mL a partir de la DM de 5 ppm y agua destilada.

1. Tomar un matraz aforado de 50 mL y pipetear un volumen X mL de la DM de 5 ppm necesario para obtener la concentración inicial deseada. Para conseguir más exactitud, las disoluciones iniciales de lindano se preparan en peso, calculando las concentraciones reales a partir del peso de los volúmenes añadidos.

El volumen de X mL de DM que habrá que añadir para obtener una concentración de Y ppb viene dado por:

$$X(mL) = Y(ppb) * \frac{1 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppb}} * 50 \text{ mL} * \frac{1}{[DM]}$$

La concentración exacta de la DM se determina en peso, por lo que habría que dividir por la concentración real de DM, que será próxima a 5 ppm. Para un valor exacto de concentración [DM] = 5 ppm, se obtendría:

$$X(mL) = Y(ppb) * \frac{1 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppb}} * 50 \text{ mL} * \frac{1}{5 \text{ ppm}}$$

$$X(mL) = Y(ppb) * \frac{1}{100} \left(\frac{mL}{ppb} \right)$$

2. Para modificar el pH de las disoluciones:
 - i. Se dispone de 3 disoluciones tampón, con pH aproximados de 3, 5 y 8,5 respectivamente.

- ii. Pipetear aproximadamente 5 mL de la disolución tampón correspondiente.
 - iii. Despues de enrasar con agua destilada, medir el pH de la disolución con el pH-metro y anotar el valor del pH.
3. Enrasar con agua destilada.
 4. Tapar y agitar para una correcta mezcla.
 5. Guardar.

Dosis de adsorbente

1. Pesar un vaso de precipitados de 100 mL en la balanza analítica y anotar el peso.
2. Añadir la masa de adsorbente necesaria y pesar de nuevo, calculando la masa de adsorbente añadida por diferencia entre la primera y la segunda pesada.

La masa de adsorbente se mezclará con el volumen fijo de disolución de 50 mL, por tanto, la masa de adsorbente A mg que habrá que añadir para obtener una concentración de adsorbente de aproximadamente B g/L viene dada por:

$$A \text{ (mg)} = B \left(\frac{g}{L} \right) * \frac{1L}{1000 \text{ mL}} * \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ g}} * 50 \text{ mL}$$

$$A \text{ (mg)} = B \left(\frac{g}{L} \right) * 50 \frac{L * mg}{g}$$

Proceso de adsorción

1. Verter la disolución del matraz aforado de 50 mL en el vaso de precipitados de 100 mL que contiene el adsorbente.
2. Añadir un imán, cubrir con parafilm y agitar:
 - a. En el agitador magnético a 750 rpm aproximadamente para ensayos a temperatura ambiente.
 - b. En la placa calefactora con agitación para ensayos donde se controle la temperatura. Perforar el parafilm con el termopar y poner en agitación (750 rpm) a la temperatura programada.
3. El tiempo de agitación deberá ser tal que garantice que se ha alcanzado el equilibrio de adsorción. Se estudiará en primer lugar el efecto del tiempo de contacto disolución-adsorbente para garantizar que se alcanza el tiempo de equilibrio en ensayos posteriores.
4. Transcurrido el tiempo de agitación, dejar enfriar en caso de las disoluciones calentadas, y filtrar para separar las fases. Para la filtración, conectar el

matraz Erlenmeyer a la bomba de vacío. Para evitar arrastre de celulosa, parar la bomba de vacío antes del secado del filtro.

5. Recoger la fase líquida y guardar para su análisis siguiendo el *Anexo 2. Protocolo de análisis de lindano*.

Ensayos de control

Los ensayos de control son muestras de lindano en agua que no se someten al proceso de adsorción y que servirán de referencia tras el análisis de las muestras. Los ensayos de control se preparan siguiendo los pasos del apartado *1.2 Disoluciones iniciales de lindano*.

Para cada muestra preparada en el apartado *1.2 Disoluciones iniciales de lindano* deberá prepararse una muestra de control con la misma concentración de lindano, que se guarda para su análisis siguiendo el *Anexo 2. Protocolo de análisis de lindano*. Es decir, si por ejemplo se realiza un ensayo con concentración inicial de lindano igual a 1 ppm, deberá prepararse también un ensayo de control con concentración 1 ppm.

Anexo 2. Protocolo de análisis de lindano

Reactivos

- Lindano (γ -HCH).
- n-Hexano 95% para análisis de pesticidas.
- Sulfato sódico anhidro.
- Acetona.

Materiales

- Dos embudos de decantación de 50 mL.
- Soporte de laboratorio y dos pinzas.
- Viales de cromatografía de 1,5 mL.
- Tres tubos de ensayo herméticos de 20 mL.
- Vial de vidrio con tapa de 20 mL.

Equipos

- Cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas (GC-MS).
- Micropipetas de 100 y 1000 μ L.
- Balanza analítica.

Procedimiento

Recta de calibrado

Se prepara una disolución madre (DM) de 1000 ppm de lindano en hexano en un tubo de ensayo hermético. A partir de esta disolución madre se preparan dos disoluciones madre intermedias (DMI):

- DMI 1 de 1 ppm de lindano en hexano.
- DMI 2 de 20 ppm de lindano en hexano.

Se utilizan disoluciones intermedias ya que hay que pesar muy poca cantidad de lindano para su preparación en un volumen final máximo de 20 mL (capacidad del tubo de ensayo hermético donde se conservarán las disoluciones madre). La DMI 1 se utilizará para preparar los patrones de concentración inferior a 1ppm y la DMI 2 para los patrones de concentración superior a 1ppm.

Se recomienda preparar al menos 5 patrones de lindano en hexano a partir de estas dos disoluciones madre intermedias. Los patrones se preparan en viales cromatográficos de 1,5 mL. En función del rango de concentración esperado para las muestras se prepararán patrones acordes a ese rango. En la Tabla A.1 se muestra un ejemplo de la concentración teórica aproximada de los patrones y los volúmenes a añadir para su elaboración a partir de las disoluciones madre de 1ppm y de 20ppm. Realizando todos los patrones de la Tabla A.1 se obtendría una recta de calibrado que

abarca concentraciones entre 30 ppb y 20 ppm. Este rango es muy amplio, por lo que se puede dividir la recta en 2 partes independientes, para obtener un mejor ajuste.

Tanto las disoluciones madre como los patrones se prepararán en peso, para conseguir más exactitud. Por ello se recalcularán las concentraciones reales de las disoluciones madre y de los patrones a partir del peso de los volúmenes añadidos.

Tabla A.1. Ejemplo de concentración de patrones y volúmenes para su preparación.

Patrón teórico aproximado (ppb)	Disolución madre 1ppm (μL)	Disolución madre 20ppm (μL)	Hexano (μL)
30	45	-	1455
50	75	-	1425
125	190	-	1310
200	300	-	1200
280	420	-	1080
350	525	-	975
500	750	-	750
1000	1500	-	0
2000	-	150	1350
4000	-	300	1200
7000	-	525	975
10000	-	750	750
15000	-	1125	375
20000	-	1500	0

Los pasos a seguir para la preparación de un patrón se muestran a continuación:

1. Pesar un vial cromatográfico de 1,5 mL con su tapa en la balanza analítica y anotar su peso exacto.
2. Añadir el volumen de disolución madre correspondiente al patrón teórico que se desee preparar (ver Tabla A 1). Cerrar rápidamente y pesar en la balanza analítica anotando el peso exacto.

3. Añadir el volumen de hexano correspondiente al patrón teórico que se desee preparar (ver Tabla A 1). Cerrar rápidamente y pesar en la balanza analítica anotando el peso exacto. Agitar con cuidado.
4. Colocar el vial en el congelador a -18 °C hasta su uso.
5. Debido a la gran volatilidad del hexano se recomienda trabajar rápidamente cerrando herméticamente las disoluciones lo antes posible y guardar en el congelador a -18 °C.

Extracción líquido-líquido

A continuación, se procede a la extracción de las disoluciones de lindano en agua recogidas tras el proceso de adsorción descrito en el *Anexo 1. Protocolo de adsorción*. La extracción líquido-líquido se lleva a cabo con hexano en dos fases, siguiendo los siguientes pasos:

1. Pipetear 40 mL de la disolución acuosa con una pipeta aforada en un embudo de decantación.
2. Pipetear 10 mL de hexano. Cerrar el embudo de decantación y agitar vigorosamente durante 5 minutos invirtiendo de vez en cuando el embudo y abriendo la llave muy lentamente para dejar salir los gases.
3. Dejar reposar el embudo en el soporte durante 15 minutos aproximadamente hasta que las dos fases se separen claramente. La fase acuosa, más densa, queda abajo y la fase orgánica queda arriba.
4. Pesar un vial de vidrio con tapa de 20 mL. Anotar el peso exacto.
5. Colocar en el soporte un segundo embudo de decantación debajo del primer embudo. Transvasar del primero al segundo la fase acuosa quitando el tapón y abriendo la llave lentamente.
6. Pipetear la fase orgánica al vial de vidrio pesado en el paso 4 y cerrar herméticamente.
7. Pipetear 5 mL de hexano de nuevo en el primer embudo. Cerrar el embudo de decantación y agitar ligeramente. Trasvasar el hexano al segundo embudo de decantación. Cerrar el segundo embudo y agitar vigorosamente durante 5 minutos invirtiendo de vez en cuando el embudo y abriendo la llave muy lentamente para dejar salir los gases.
8. Dejar reposar el embudo en el soporte durante 15 minutos aproximadamente hasta que las dos fases se separen claramente.
9. Desechar definitivamente la fase acuosa y recuperar la fase orgánica que se llevará al vial del paso 4.
10. Pesar el vial con tapa anotando el peso exacto tras las dos extracciones.

11. Añadir una pequeña cantidad de sulfato sódico anhídrico y agitar. Trasvasar con la micropipeta 1500 μL con cuidado de no arrastrar partículas sólidas a un vial cromatográfico de 1,5 mL que se reserva a -18 °C hasta su análisis.

Se limpian los embudos de extracción con acetona para su uso con las siguientes muestras.

Análisis de lindano

Una vez preparados los patrones en los viales y realizadas las extracciones de las muestras de un ensayo se procede a su medición en el cromatógrafo. Para ello se siguen los siguientes pasos generales:

- Selección de método pesticidas fríos en el GC/MS.
- Generar listado de muestras.
- Colocar viales en la gradilla del Autosampler.
- Asegurarse que los viales de limpieza con diclorometano están llenos.

Una vez inyectados, se procede a la integración seleccionando para ello las masas características del lindano (180-187 y 215-223). Se realiza la inyección de cada muestra por duplicado.

Se lleva a cabo la integración automática y se anota el área correspondiente. El área obtenida se lleva a la recta de calibrado, que permite relacionarla con la concentración de lindano en hexano. Como en el proceso de extracción se ha utilizado un volumen de 15 mL de hexano para extraer 40 mL de agua, la concentración de lindano en agua será:

$$C_L^{\text{agua}} = C_L^{\text{hexano}} * \frac{15 \text{ mL hexano}}{40 \text{ mL agua}}$$

Anexo 3. Condiciones instrumentales de la cromatografía

Control Information

Sample Inlet : GC
Injection Source : GC ALS
Mass Spectrometer : Enabled

=====

=====

=====

6890 GC METHOD

=====

=====

OVEN

Initial temp: 80 'C (On) Maximum temp: 325 'C
Initial time: 2.00 min Equilibration time: 0.50 min

Ramps:

#	Rate	Final temp	Final time
1	35.00	140	23.00
2	1.00	150	0.00
3	20.00	280	1.00
4	40.00	320	4.79
5	0.0(Off)		

Post temp: 0 'C

Post time: 0.00 min

Run time: 50.00 min

FRONT INLET (SPLIT/SPLITLESS)

Mode: Pulsed Splitless
Initial temp: 250 'C (On)
Pressure: 155.9 kPa (On)
Pulse pressure: 320 kPa
Pulse time: 2.00 min
Purge flow: 30.0 mL/min
Purge time: 3.00 min
Total flow: 35.5 mL/min
Gas saver: Off
Gas type: Helium

BACK INLET (SIM DIST)

Flow: 0.0 mL/min (Off)
Gas type: Helium

COLUMN 1

Capillary Column

Model Number: J&W 122-5532

DB-5ms

Max temperature: 325 °C

Nominal length: 30.0 m

Nominal diameter: 250.00 um

Nominal film thickness: 0.25 um

Mode: constant pressure

Pressure: 155.9 kPa

Nominal initial flow: 2.4 mL/min

Average velocity: 57 cm/sec

Inlet: Front Inlet

Outlet: MSD

Outlet pressure: vacuum

FRONT DETECTOR (NO DET)

SIGNAL 1

Data rate: 20 Hz

Type: test plot

Save Data: Off

Zero: 0.0 (Off)

Range: 0

Fast Peaks: Off

Attenuation: 0

BACK DETECTOR (NO DET)

SIGNAL 2

Data rate: 20 Hz

Type: test plot

Save Data: Off

Zero: 0.0 (Off)

Range: 0

Fast Peaks: Off

Attenuation: 0

COLUMN COMP 1

(No Detectors Installed)

COLUMN COMP 2

(No Detectors Installed)

THERMAL AUX 2

Use: MSD Transfer Line Heater

Description:

Initial temp: 280 °C (On)

Initial time: 0.00 min

Rate Final temp Final time

1 0.0(Off)

GC Injector

Front Injector:

Sample Washes 2
Sample Pumps 2
Injection Volume 0.20 microliters
Syringe Size 10.0 microliters
PreInj Solvent A Washes 1
PreInj Solvent B Washes 1
PostInj Solvent A Washes 2
PostInj Solvent B Washes 2
Viscosity Delay 1 seconds
Plunger Speed Fast
PreInjection Dwell 0.00 minutes
PostInjection Dwell 0.00 minutes

Column 1 Inventory Number : AB001

Column 2 Inventory Number :

MS ACQUISITION PARAMETERS

General Information

Tune File : atune.u
Acquisition Mode : Scan/SIM

MS Information

Solvent Delay : 10.00 min

EMV Mode : Gain Factor
Gain Factor : 8.00
Resulting EM Voltage : 2529

[Scan Parameters]

Low Mass : 170.0
High Mass : 330.0
Threshold : 300
Sample # : 3 A/D Samples 8

[Sim Parameters]

GROUP 1

Group ID : HCH

Resolution : High

Plot 1 Ion : 219.00

Ions/Dwell In Group (Mass, Dwell) (Mass, Dwell) (Mass, Dwell)

(181.00, 120) (183.00, 120) (217.00, 120)

(219.00, 120)

GROUP 2

Group ID : TPP

Resolution : High

Group Start Time : 35.00

Plot 1 Ion : 326.00

Ions/Dwell In Group (Mass, Dwell) (Mass, Dwell) (Mass, Dwell)

(215.00, 140) (325.00, 140) (326.00, 140)

[MSZones]

MS Source : 250 C maximum 280 C

MS Quad : 150 C maximum 200 C

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

TUNE PARAMETERS for SN: US62743776

Trace Ion Detection is OFF.

EMISSION: 34.610

ENERGY: 69.922

REPELLER: 16.553

IONFOCUS: 80.667

ENTRANCE_LE: 25.500

EMVOLTS: 1764.706

Actual EMV: 2529.41

GAIN FACTOR: 7.98

AMUGAIN: 1514.000

AMUOFFSET: 123.750

FILAMENT: 1.000

DCPOLARITY: 0.000

ENTLENSOFFS: 17.820

MASSGAIN: -887.000

MASSOFFSET: -39.000

END OF TUNE PARAMETERS