



ESCOLA D'ENGINYERIA D'IGUALADA

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA

TREBALL FI DE CARRERA

TÍTOL TREBALL

ANEXO

**AUTOMATIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE LOS PESTICIDAS
ORGANOCORADOS Y HIDROCARBUROS AROMATICOS POLICICLICOS**

AUTOR(S)

CONCEPCIÓN GÓMEZ CAVERO

DOCUMENTS

MEMÒRIA

ANEXOS

CONVOCATÒRIA

JUNIO 2012

TUTOR(S)

JOAQUIM FONT

ROSA CUADROS

INDICE

15 ANEXO.....	2
1.- Definiciones.....	2
2.- Preparación / Modificación de un método:.....	3
3.- Ejemplo de cálculos de los resultados:	5
4.- Cromatogramas de una muestra real	11

15 ANEXO

1.- Definiciones

Extracción en fase sólida (SPE): es un proceso de separación mediante el cual los compuestos que se disuelven o suspenden en una mezcla líquida se separan a partir de otros compuestos en la mezcla de acuerdo con sus propiedades físicas y químicas. Los laboratorios analíticos utilizan la extracción en fase sólida para concentrar y purificar las muestras para su análisis. Extracción en fase sólida puede utilizarse para aislar analitos de interés a partir de una amplia variedad de matrices como en nuestro caso agua.

SPE utiliza la afinidad de los solutos disueltos o suspendidos en un líquido para un sólido a través del cual se hace pasar la muestra para separar una mezcla en sus componentes deseados y no deseados.

Extracción líquido-líquido: también conocido como extracción con disolventes y la partición, es un método para separar los compuestos basados en sus relativas solubilidades en dos líquidos inmiscibles, normalmente agua y un disolvente orgánico . Es una extracción de una sustancia a partir de un líquido de fase en otra fase líquida. Extracción líquido-líquido es una técnica básica en laboratorios químicos, donde se realiza utilizando un embudo de separación .

2.- Preparación / Modificación de un método:

Clicar la pestaña “Admin”. Aparece la pantalla de la figura 1

Clicar sobre “Method Editor”. Poner la contraseña y se abre la pantalla. Figura 2

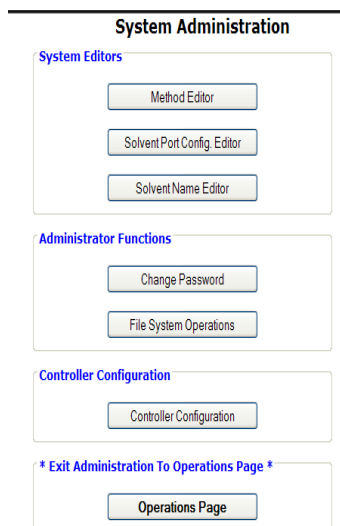


Fig.1

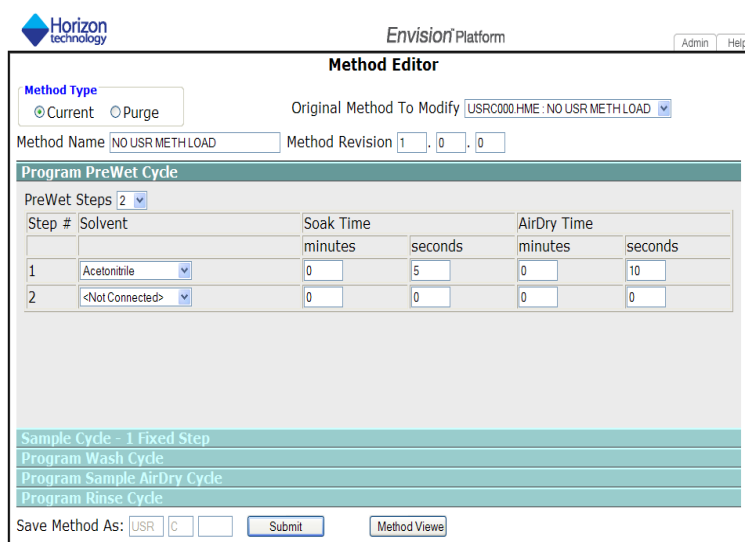


Fig.2

Seleccionar en “Method type” “Current” si se trata de un método de extracción o “Purge” si se trata de un método de purga del sistema.

Si queremos modificar un método ya existente seleccionarlo en el desplegable “Original Method to modify”. En caso de ser un método nuevo, no tocar esta ventana y escribir en “Method name” el nombre del nuevo método.

Si se modifica un método cambiar la numeración en “Method Revision” para llevar un control de las revisiones realizadas.

Seleccionar “Program Prewet Cycle”, que es por el acondicionamiento del disco.

Figura 2

En “Prewet steps” seleccionar el número de etapas a hacer.

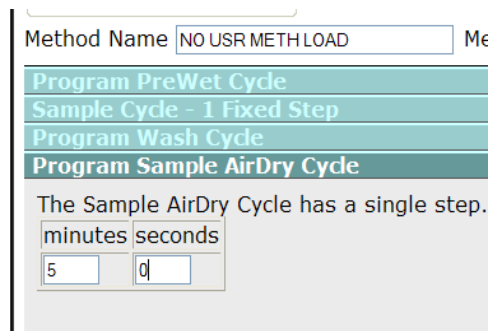
Para cada etapa seleccionar el disolvente, el tiempo de contacto del disolvente con el disco (“Soak time”) y el tiempo que pasará aire a través del disco una vez haya pasado el disolvente (“Air dry time”).

Se pueden añadir o eliminar etapas modificando el número de “Prewet steps”.

“Sample Cycle” é una etapa fijada y no se puede modificar.

En “Program Wash” cycle se programan etapas de limpieza en el paso de la muestra y la elución del disco.

En “Program Sample AirDry Cycle” se programa el tiempo que pasará aire por el disco para secarlo. Figura 3



Method Name Me

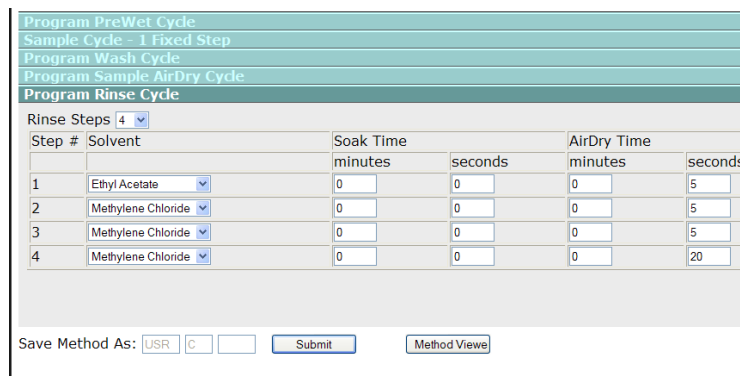
Program PreWet Cycle
Sample Cycle - 1 Fixed Step
Program Wash Cycle
Program Sample AirDry Cycle

The Sample AirDry Cycle has a single step.

minutes seconds

Fig. 3

En “Program Rinse Cycle” se programa el método de elución seleccionando primero el número de etapas. Después para cada etapa seleccionar el disolvente, el tiempo de contacto y el tiempo de secado. Figura 4



Program PreWet Cycle
Sample Cycle - 1 Fixed Step
Program Wash Cycle
Program Sample AirDry Cycle
Program Rinse Cycle

Rinse Steps 4

Step #	Solvent	Soak Time		AirDry Time	
		minutes	seconds	minutes	seconds
1	Ethyl Acetate	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="5"/>
2	Methylene Chloride	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="5"/>
3	Methylene Chloride	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="5"/>
4	Methylene Chloride	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="20"/>

Save Method As:

Fig. 4

El software guarda los métodos con el nombre y el número correlativo. Una vez finalizado el método escribir en “Save Method as” un número de orden.

Clicar “Submit”

Para volver a la pantalla inicial del programa, clicar la pestaña “Admin” y aparecerá la pantalla (Fig1). Pinchar sobre “Operations Page”.

3.- Ejemplo de cálculos de los resultados:

A continuación se explica cómo se han llevado a cabo los cálculos que se han presentado en la memoria.

Para esta explicación solo se ha escogido un compuesto de los POCs, concretamente el alfa-HCH y se ha explicado paso por paso de donde sale cada valor.

En el caso de los POCs el patrón interno es el Quintozene mientras que para el caso de HAPs el patrón interno es el 2-metilcriseno.

El resto de POCs y los HAPs no se especifican porque el cálculo es exactamente el mismo y lo único que varía son las áreas que nos dan los cromatogramas para cada compuesto.

- **Linealidad**

Para la linealidad se realiza una curva de calibración en nuestro caso para POCs son las siguientes concentraciones 0.005, 0.02, 0.05, 0.08, 0.1 µg/L dopando agua Milli Q con el patrón *Method-508 – Chlorinated Pesticides* d'AccuStandard ref.- M-508P-A siguiendo el PNT-M42.

El área nos la proporciona el cromatograma para cada compuesto y para cada concentración esta varía.

El Ratio se calcula a través del área del compuesto a una concentración y el área del patrón (Quintozene) a la misma concentración. Y así con todos los puntos de la recta.

$$r = \frac{\text{área compuesto a una concentración}}{\text{área patrón interno}} = \frac{7479 (\text{concentración } 0.005)}{31715}$$

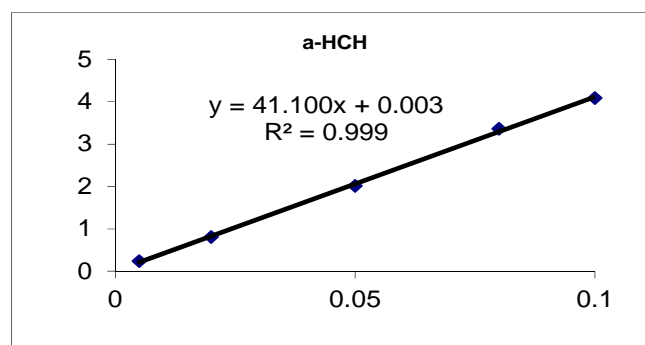
$$r = 0.24$$

Compuesto		Conc.(µg/L)	Área	Ratio
alfa-HCH	1.-	0.005	7479	0.24
	2.-	0.02	15370	0.81
	3.-	0.05	58074	2.01
	4.-	0.08	58760	3.36
	5.-	0.1	63833	4.08

Compuesto		Área
Quintozene	1.-	31715
	2.-	19070
	3.-	28909
	4.-	17486
	5.-	15628

Una vez calculado el ratio procedemos a calcular la linealidad respecto a este compuesto (alfa-HCH) donde se encuentra representado ($y=ax+b$):

- eje de las x : la concentración
- eje de las y: el ratio



A partir de aquí las linealidades de los demás compuestos se calculan de la misma manera.

- **Límite de detección** es la concentración mínima capaz de ser detectada por el método analítico.

Se calcula con el patrón de concentración más cercano al LOD de cada compuesto.

<i>alfa</i> -HCH	patrón (ng/L).-	5
	Altura patrón	1867
	ruido	120
	S/N.-	15.56
	LOD.-	0.96

$$\text{LOD} = \frac{\text{patrón} \times \text{ruido} \times 3}{\text{altura del patrón}} = \frac{5 \times 120 \times 3}{1867}$$

$$\text{LOD} = 0.96 \text{ ng/L}$$

- **Precisión del método** puede ser definida ya sea respecto a la repetitividad (a), a la reproductibilidad (b) o a las dos. En la precisión del método se valora la concordancia de los resultados y no su desviación respecto a una concentración conocida.

a) **Precisión de repetitividad:** Para la repetitividad se han hecho unas muestras con el mismo método, mismo analista y mismo día, es decir sin variaciones en las condiciones de medida.

Las siguientes muestras se hicieron de la siguiente manera:

Tres réplicas en el mismo día y el mismo analista y después 4 réplicas en otro día y con diferente analista.

Las muestras de Agua de salida de Planta del Llobregat están dopadas con 50 ng/L de patrón.

Para cada día y diferente analista calculamos la media, desviación estándar y la repetitividad (rsd) como se ve a continuación:

<u>Compuesto</u>	<u>Réplica</u>	<u>Área</u>	<u>ratio</u>	<u>Conc (ng/L)</u>
<i>alfa</i> -HCH	1.-	28053	2.01	48.69
	2.-	50278	2.01	48.78
	3.-	57507	1.90	46.13
	media.-	45279	2	47.87
	sd.-	15350	0	1.50
	rsd.-	34	3	3.14

Compuesto	Réplica	Área
Quintozene	1.-	13991
	2.-	25031
	3.-	30271
	media.-	23098
	sd.-	8310
	rsd.-	36

<u>Compuesto</u>	<u>Réplica</u>	<u>Área</u>	<u>ratio</u>	<u>Conc (ng/L)</u>
<i>alfa</i> -HCH	4.-	40123	1.91	46.43
	5.-	37429	1.95	47.30
	6.-	37774	1.98	48.23
	7.-	45400	2.00	48.71
	media.-	40182	2	47.67
	sd.-	3679	0	1.01
	rsd.-	9	2	2.13

Compuesto	Réplica	Área
Quintozene	4.-	20998
	5.-	19226
	6.-	19031
	7.-	22646
	media.-	20475
	sd.-	1696
	rsd.-	8.28

El área es una información que te da el cromatograma independiente de cada compuesto.

El ratio se calcula tal y como hemos comentado en el apartado anterior:

$$r = \frac{\text{área compuesto a una concentración}}{\text{área patrón interno}} = \frac{28053 \text{ (concentración 0.005)}}{13991}$$
$$r = 2.01$$

La concentración se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Concentración (ng/L)} = \frac{\text{Ratio}-b}{a} \times 1000 = \frac{2.01-0.003}{41.110} \times 1000$$

$$\text{Concentración (ng/L)} = 48.82 \text{ ng/L}$$

Siendo a y b coordenadas de la recta de calibración.

A partir de aquí calculamos la media y la desviación estándar para poder calcular la repetitividad (rsd):

$$\text{rsd} = \frac{\text{sd}}{\text{media}} \times 100 = \frac{1.50}{47.87} \times 100$$

$$\text{rsd} = 3.14$$

- b) **Precisión de reproducibilidad:** Para la reproducibilidad lo que hacemos es coger todas las réplicas (en este caso 7) las cogemos todas porque son muestras en las que han intervenido los factores de cambio de día y cambio de analista por lo que ahora calculamos la reproducibilidad (rsd) a través de la media y la desviación estándar.

<u>Compuesto</u>	<u>Réplica</u>	<u>Área</u>	<u>ratio</u>	<u>Conc (ng/L)</u>
<i>alfa</i> -HCH	1.-	28053	2.01	48.72
	2.-	50278	2.01	48.81
	3.-	57507	1.90	46.16
	4.-	40123	1.91	46.43
	5.-	37429	1.95	47.30
	6.-	37774	1.98	48.23
	7.-	45400	2.00	48.71
	mitja.-	42366	1.97	47.77
	sd.-	9630	0.05	1.13
	rsd.-	22.73	2.37	2.37

Los cálculos son exactamente iguales que para la repetitividad lo único que cambia son la cantidad de réplicas ya que se cogen todas para poder hacer la reproducibilidad.

- **Exactitud:** es la concordancia de la concentración obtenida, según el método analítico a validar, dopando muestras de concentración conocida del patrón. Se calcula de la siguiente manera:

$$E = \frac{(\text{concentración}) - 50}{50} \times 100 = \frac{48.72 - 50}{50} \times 100$$

$$E = -2.56$$

Donde 50 es la concentración del patrón con la que hemos dopado el Agua de salida de planta del Llobregat.

<u>Compuesto</u>	<u>Réplica</u>	<u>Área</u>	<u>ratio</u>	<u>Conc (ng/L)</u>	<u>exactitud</u>
<i>alfa</i> -HCH	1.-	28053	2.01	48.72	-2.56
	2.-	50278	2.01	48.81	-2.38
	3.-	57507	1.90	46.16	-7.68
	4.-	40123	1.91	46.43	-7.14
	5.-	37429	1.95	47.30	-5.39
	6.-	37774	1.98	48.23	-3.54
	7.-	45400	2.00	48.71	-2.57
	mitja.-	42366	1.97	47.77	-4.47
	sd.-	9630	0.05	1.13	
	rsd.-	22.73	2.37	2.37	

4.- Cromatogramas de una muestra real

A continuación se pueden observar los cromatogramas correspondientes a una muestra real.

TIC de la adquisición en SIM (Total ion chromatogram)

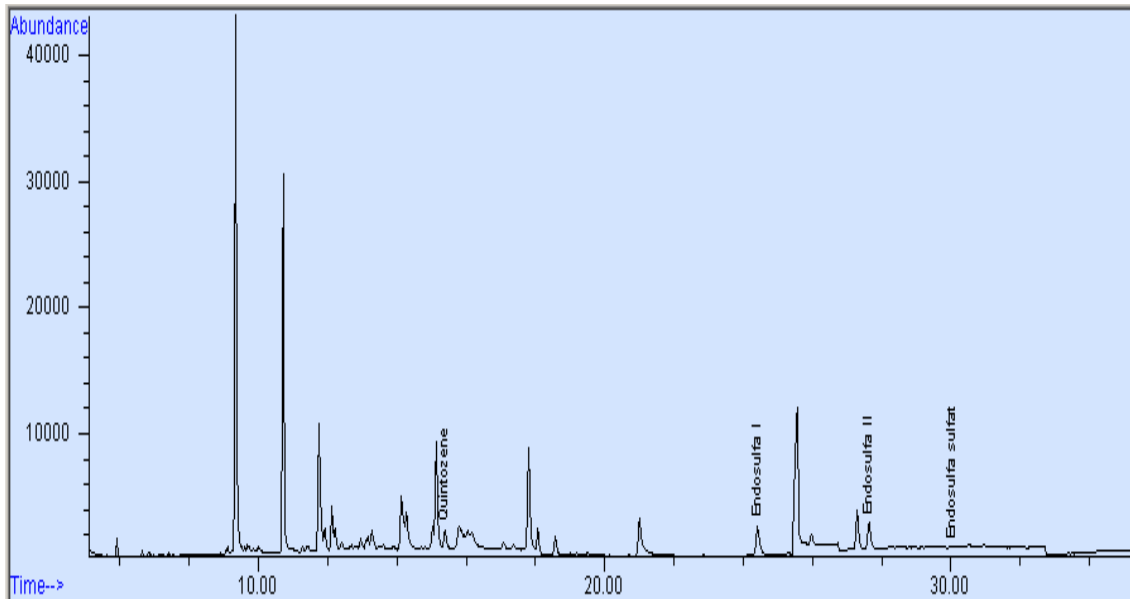


Fig. 1: Cromatograma 1

En este cromatograma se puede observar los picos de algunos de los compuestos de POCs como son el Endosulfan I, Endosulfan II y en una pequeña cantidad el Endosulfan sulfato.

También al principio del cromatograma observamos el pico del patrón interno Quintozene.

Endosulfan I:

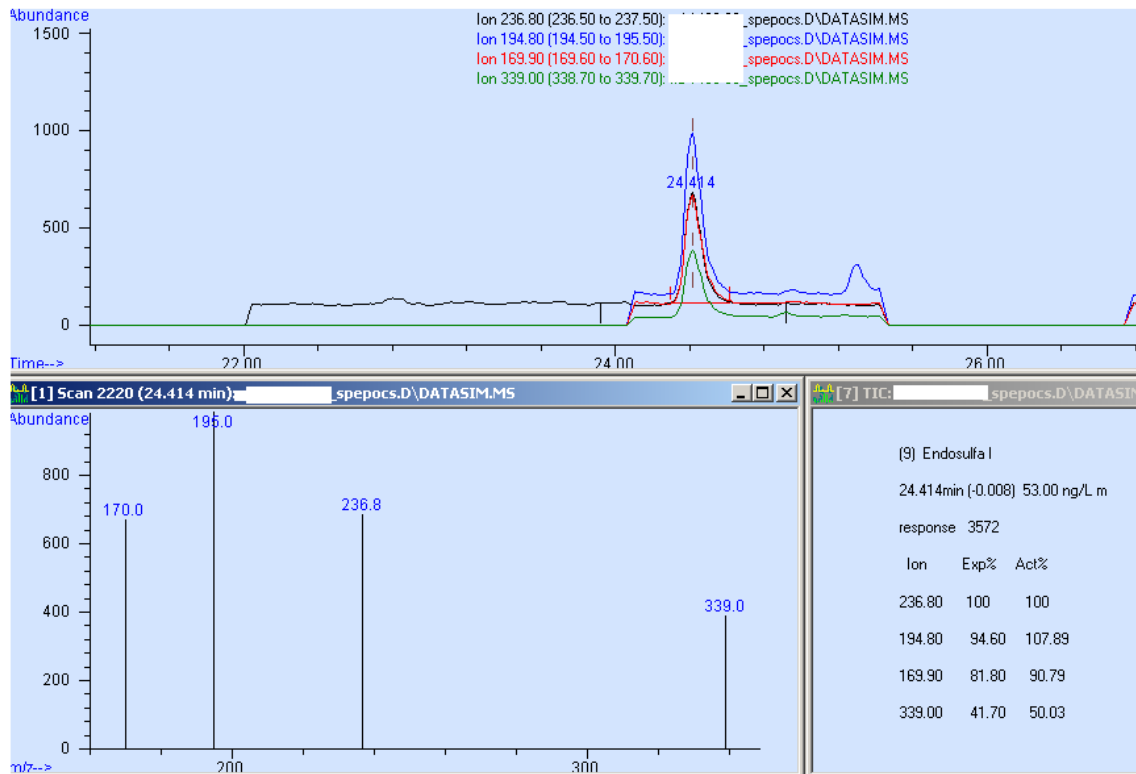


Fig 2: Cromatograma 2

En este cromatograma observamos un cromatograma por ion, mientras que en el cromatograma 1 (figura 1) lo que veíamos era simplemente un pico. El pico de la figura 1 se refiere a la suma de todos los iones.

Lo primero que observamos en este cromatograma es el tiempo que es de 24.414min para el Endosulfan I. Después observamos los diferentes iones en colores para identificar mejor cada ion y sus masas.

Debajo del cromatograma a la izquierda podemos observar las masas de los 4 iones que vemos.

A la derecha vemos un conjunto de datos donde tenemos toda la información necesaria para poder cuantificar.

En primer lugar tenemos una columna con los 4 iones clasificados por sus masas, al lado tenemos una segunda columna donde pone Exp%, esta columna es la que nos indica la proporción de cada ión de manera teórica.

Y la tercera columna que pone Act% lo que nos indica es la proporción de cada ión experimental. Se acepta una tolerancia del 20% respecto a la teórica.

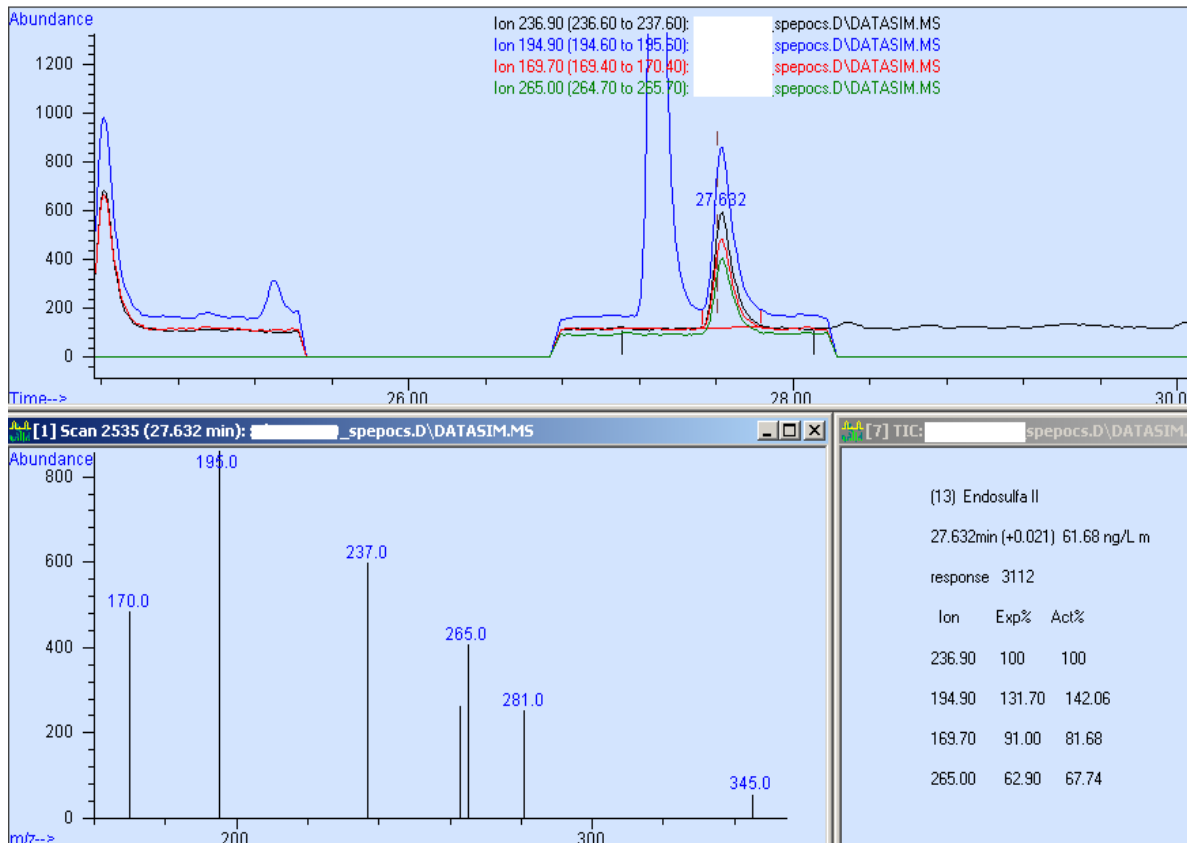
Estas proporciones la sabemos gracias al patrón que previamente se ha inyectado y también a los tiempos de retención.

El primer ion de la primera columna (236.80) que podemos ver es con el que cuantificamos mientras que el conjunto de los cuatro iones nos sirven para identificar el compuesto.

Podemos observar que en este recuadro también tenemos un dato que pone Response 3572, este dato se refiere al área para el ion de cuantificación de nuestra muestra. Este área (corregida por el patrón interno) se interpola en la recta de calibrado obteniendo así la concentración.

Resultado Endosulfan I: 0.053 µg /L.

Endosulfan II



Resultado Endosulfan II: 0.062 µg/L