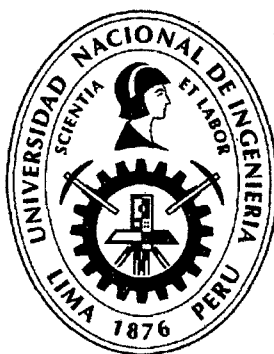


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Química



Tesis para optar el Título Profesional de:

Licenciado en Química

Titulada:

“Análisis de hidrocarburos totales de petróleo (C₁₀-C₄₀) y de hidrocarburos aromáticos policíclicos (fenantreno, pireno y benzo(a) antraceno) para muestras de aguas y suelos mediante cromatografía de gases”

Presentado por:

Marcelo Bazán, John Franklin

Asesor:

Doctor Gino Picasso Escobar

LIMA-PERÚ

2013

1

Digitalizado por:

**Consortio Digital del
Conocimiento MebLatam,
Hemisferio y Dalse**

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	2
RESUMEN.....	6
AGRADECIMIENTOS.....	7
GLOSARIO USADO EN ESTE TRABAJO.....	8
I. INTRODUCCION.....	9
I.1.- IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO.....	10
I.2.IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS MÉTODOS CROMATROGRÁFICOS	11
I.3 OBJETIVOS.....	13
I.4 RELEVANCIA DEL TEMA.....	13
II. MARCO TEÓRICO.....	14
II.1 HIDROCARBUROS DE PETROLEO.....	15
II.1.1 Definición.....	15
II.1.2 Clasificación:.....	15
II.1.2.A. Hidrocarburos Saturados.....	15
II.1.2.B. Hidrocarburos insaturados.....	16
II.1.2.C. Compuestos aromáticos.....	16
II.1.2.C.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's).....	17
II.1.2.D. Otros compuestos.....	18
II.1.3. Propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos.....	19
II.1.3.A. Densidad.....	19
II.1.3.B. Polaridad.....	19
II.1.3.C. Solubilidad en agua.....	19

II.1.3.D. Presión de vapor.....	19
II.1.4. Impactos ambientales producidos por los hidrocarburos de petróleo	20
II.1.4.A. Contaminación del agua	21
II.1.5. Efectos de los hidrocarburos en la salud humana	22
II.1.6. Análisis de Hidrocarburos	24
II.2 METODO DE ANALISIS	24
II.2.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES	24
II.2.2. Parámetros Fundamentales en Cromatografía de Gases.....	26
II.2.2.A. Constante de Distribución ó de reparto.....	26
II.2.2.B. Factor de Capacidad	27
II.2.2.C. Factor de Selectividad	28
II.2.2.D. Eficiencia de una Columna.....	30
II.2.2.E. Resolución de una Columna.....	35
II.2.3. PARTES DE UN SISTEMA CROMATOGRAFICO	38
II.2.3.A. Fuente de Gas Portador	38
II.2.3.B Sistema de inyección ó introducción de la muestra	40
II.2.3.B.1. Inyección Split (con división de flujo).....	42
II.2.3.B.2. Inyección Splitless (sin división de flujo)	44
II.2.4.1 Cromatografía isothermal.....	45
II.3.3.2 Cromatografía con temperatura programada.....	45
II.2.5 Detectores	47
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	50
III.1 INTRODUCCIÓN.....	51
III.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	51
III.2.1 Materiales	51

III.2.2	Reactivos	53
III.2.2.A	Estándares y diluciones	53
III.2.2.A.1	Estándares de Calibración de petróleo Diesel	53
III.2.3.A.2	Estándar de Alcanos – Ventana de Integración D2887	54
III.2.3.	EQUIPOS	55
III.3	PROCEDIMIENTO	56
III.3.1	Toma de muestras	57
III.3.2	Proceso de extracción	59
III.3.2.1	Método de extracción liquido-liquido	59
III.3.2.2	Método de extracción solido-liquido	62
III.3.3	Proceso de Limpieza Clean-Up	64
III.3.3.A	Descripción general del Proceso	64
III.3.4.	Proceso de análisis cualitativo y cuantitativo	69
III.3.4.1	El Cromatograma	69
III.3.4.2	Análisis Cualitativo	70
III.3.4.3	Análisis Cuantitativo	71
III.3.4.3.A	Calibración estándar externa	72
III.3.4.3.B	Calibración Estándar Interno	73
III.4	METODOLOGIA	75
III.4.1	Columnas disponibles para el análisis	75
III.4.2	Método de Lectura Cromatográfica	76
III.4.2.1	Análisis de Hidrocarburos totales de Petróleo (TPH)	76
III.4.2.2	Análisis de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's)	78
III.4.3	Configuraciones cromatográficas para la aplicación del método de análisis	79
III.4.3.1	Primera configuración cromatográfica	79

III.4.3.2 Segunda configuración cromatográfica	80
IV. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	82
IV.1. ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (C10-C40).....	83
IV.1.1 Identificación de los Hidrocarburos.....	84
IV.1.2 Cuantificación de los TPH (C10-C40).....	86
IV.1.3 Análisis de las muestras de agua y suelo	89
IV.1.3.1 Tratamiento de la muestra.....	89
A. Proceso de extracción	89
B) Proceso de limpieza (clean-up)	91
IV.1.4 Cuantificación de las muestras trabajadas.....	99
IV.2 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's).....	104
IV.2.1 Cuantificación de las muestras trabajadas.....	105
IV.3 RESUMEN DE RESULTADOS	108
IV.3.1 Determinación de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (C10-C40).....	108
IV.3.2 Determinación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's)	109
V. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES	112
V.1 CONCLUSIONES.....	113
V.2 RECOMENDACIONES.....	114
VI. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....	115
BIBLIOGRAFIA	116
VII. ANEXOS	121

RESUMEN

En el presente trabajo, se han implementado métodos cromatográficos para el análisis de los hidrocarburos totales de petróleo C10-C40 (TPH) y de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's: fenantreno, pireno y benzo(a)antraceno) para muestras de agua y suelo, provenientes de empresas mineras y petroleras mediante cromatografía de gases, para el caso de TPH, la identificación se realizó con el cromatógrafo de gases GC-Varian 450C y para los PAH's, el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas GC-MS Shimadzu QP20; encontrando en cada caso la configuración más apropiada que incluye el diseño del esquema experimental: cantidad, extracción, limpieza, concentración, acondicionamiento de la columna, y finalmente el acondicionamiento del detector FID y el espectrómetro de masas, para obtener en el menor tiempo posible los picos con mayor resolución y reproducibilidad.

Para el tratamiento de las muestras de agua y suelo se aplica el método de extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido, respectivamente, con diclorometano como solvente de extracción, luego se purifica la muestra y se hace la lectura en el cromatógrafo de gases GC-Varian 450C, para el caso de TPH.

Para el caso de PAH's (fenantreno, pireno, benzo(a) antraceno), la lectura se hace en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas GC-Shimadzu QP2010.

AGRADECIMIENTOS

- Agradecer primeramente a Dios por la vida, por las fuerzas que me da día tras día, por cuidarme, por su gran amor y la sabiduría que da cada día.
- A mis padres Teófilo y Judith por su gran amor y porque siempre están cerca de mi apoyándome, dándome fuerzas y ánimos en todo momento.
- A mis hermanas Lisbeth y Mónica quienes son el complemento perfecto, a quienes admiro y son ejemplos de vida y a toda mi familia que estuvo apoyándome constantemente.
- A mi director de tesis, Dr. Gino Picasso Escobar; por su paciencia, quien con su apoyo y disponibilidad me ayudo a realizar esta tesis.
- A mis amigos Carlos del Águila, José Ingaruca, Enrique Quevedo y Cesar Zavala, por brindarme sus conocimientos y experiencia en el área de cromatografía.

GLOSARIO USADO EN ESTE TRABAJO

GC	Cromatógrafo de Gases.
TPH	Hidrocarburos Totales de Petróleo.
PAH's	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.
GC-MS	Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.
FID	Detector de Ionización de Llama.
ECD	Detector de Captura de Electrones.
MINAM	Ministerio del ambiente.
OEFA	Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental.
EPA	Enviromental Protection Agency.
ECAs	Estándares de Calidad Ambiental.
STD	Estándar.
TCD	Detector de Conductividad Térmica.
MS	Espectrómetro de Masas.
GSC	Cromatografía gas - sólido.
GSL	Cromatografía gas - líquido.

I. INTRODUCCION

I.1.- IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO.

El término hidrocarburos totales de petróleo (abreviado TPH, en inglés) se usa para describir una gran familia de varios cientos de compuestos químicos que tiene como origen el petróleo crudo. Debido a que hay muchos productos químicos diferentes en el petróleo crudo y en otros productos derivados del petróleo, no es práctico medir cada uno en forma separada. Sin embargo, es útil medir la cantidad total de TPH en una muestra con el objeto de conocer los niveles de contaminación [1].

Los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) son una mezcla de muchos compuestos diferentes. La naturaleza y el hombre están expuestos a los TPH de diferentes fuentes, incluyendo gasolineras, aceite derramado sobre el pavimento, y sustancias químicas usadas en el hogar y en el trabajo. Algunos compuestos de los TPH pueden afectar al sistema nervioso, produciendo dolores de cabeza y mareo, dentro de los cuales se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's), estos compuestos están ampliamente distribuidos en el medio, como resultado de numerosas actividades humanas, aunque también tienen un origen natural. Estos contaminantes también han adquirido una notable importancia debido a su persistencia en el medio, ya que muchos de ellos son potentes tóxicos, mutágenos y teratógenos para los organismos acuáticos e incluso para el hombre, lo que los llevó a ser considerados contaminantes prioritarios por la Agencia Americana de la Protección del Medio Ambiente (EPA) y la Unión Europea (Directiva 2000/60/EC) [2]. Dentro de los hidrocarburos aromáticos policíclicos considerados como contaminantes prioritarios para el medio ambiente son el fenantreno, fluoranteno, benzo(a) antraceno, y otros [3].

Se ha encontrado TPH en por lo menos 23 de los 1,467 sitios de la Lista de Prioridades Nacionales identificados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA)[4].

La actividad petrolera, el manejo diario de hidrocarburos, en algunos casos conlleva a la contaminación del agua cuando tanques de reserva, oleoductos y diversas instalaciones sufren pérdidas por fallas ó descuidos humanos. Estos líquidos por el relieve de la topografía migran hacia cursos de agua, suelo, subsuelo, y hacia aguas subterráneas. La contaminación de aguas y suelos por hidrocarburos, tiene un efecto sobre sus propiedades.

La determinación cuantitativa de los compuestos de origen del petróleo es muy importante en aguas naturales y residuales, por la disminución en el contenido de oxígeno [1].

El medio ambiente es un sistema frágil, la presencia de los hidrocarburos en él, puede causar la alteración física y química de los hábitats naturales de las especies, si los vertidos son en agua, la alteración de la cadena alimenticia por la contaminación de especies, moluscos, que aunque sobrevivan y se acoplen a las nuevas condiciones de su hábitat, estos pueden ser un gran peligro para los seres humanos si los consumen. La pérdida de la flora y fauna es un gran problema no solo por la pérdida de especies sino por la alteración que sufre el sistema. Es importante mencionar que los lugares donde se puede dar la contaminación por hidrocarburos son zonas de gran fragilidad ambiental.

Las diferentes actividades humanas que han usado combustibles fósiles han producido contaminación por residuos de hidrocarburos en el medio ambiente, en especial en su almacenamiento, distribución y uso, por lo que existe la necesidad de regular las actividades que empleen este tipo de combustible. En nuestro país las normas que regulan su nivel de contaminación son La Ley Orgánica de Hidrocarburos - Ley No. 28611 , en concordancia con el DECRETO SUPREMO N° 002-2008- del MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM)- que establecen los estándares de calidad ambiental (ECA) para TPH's en suelos y aguay el método de análisis recomendado es por cromatografía de gases [5,6].

I.2.IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LOS MÉTODOS CROMATROGRÁFICOS

La cromatografía es un método fisicoquímico de separación para la caracterización de mezclas complejas. Es el conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separarlos distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes [7].

El empleo de Cromatografía de Gases (GC) en conjunto con otras técnicas, especialmente la espectrometría de masas, ha aumentado espectacularmente sus posibilidades, siendo factible la separación, cuantificación y subsiguiente caracterización de una gran variedad de productos en distintas mezclas, desde gases permanentes y mezclas de isótopos, hasta

aceites esenciales en perfumes, ácidos grasos en grasas animales y agentes contaminantes en aguas y suelos.

Además de las aplicaciones típicamente analíticas, la GC puede utilizarse a escala preparativa para la obtención de compuestos de elevada pureza, así como también es posible la obtención de datos fisicoquímicos relativos a propiedades superficiales, cinética y termodinámica de procesos de adsorción y separación, desarrollo de catalizadores, entre otros.

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos fisicoquímicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles. Una fase es estacionaria y la otra móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna que contiene una fase estacionaria distribuida. Las especies de la muestra experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el que es retenido más fuertemente eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra. Después de que los componentes hayan pasado por la fase estacionaria, separándose, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto [8].

Actualmente en el Laboratorio de Investigación de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería se cuenta con un cromatógrafo de Gases(VARIAN GC 450) con detector TCD, FID, ECD, que se puede utilizar para el análisis de diversos contaminantes orgánicos derivados del petróleo como: Diesel y gasolina. Estos análisis pueden ser un apoyo en la generación de mapas de contaminación, estudios de línea base en proyectos de impacto ambiental, monitoreos de sitios contaminados y abandonados, donde se realiza la respectiva declaración de pasivo ambiental requerido por el Ministerio del Ambiente.

I.3 OBJETIVOS

Generales

- Implementar método de análisis de hidrocarburos totales de petróleo (C10-C40), basados según el método EPA 8015C, que permite cuantificar los hidrocarburos en muestras de aguas y suelo mediante cromatografía de gases.

Específicos

- Detectar la presencia de TPH (C10-C40) en muestras reales (aguas y suelos) provenientes de Empresas Mineras y Petroleras, y establecer casos de contaminación, mediante la comparación de los resultados obtenidos con los estándares de calidad ambiental (ECAs) en la legislación del País.
- Detectar la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's): fenantreno, pireno y benzo(a) antraceno en las muestras reales provenientes de Empresas Mineras y Petroleras.

I.4 RELEVANCIA DEL TEMA

El temario de esta Tesis consiste en implementar métodos de análisis para la determinación de hidrocarburos totales de petróleo (C10-C40) en muestras reales tanto para aguas y para suelos mediante el cromatógrafo de gases GC-Varian 450C del Laboratorio de Investigación de Físicoquímica de la Facultad de Ciencias y el cromatógrafo de gases Agilent 7890N perteneciente al Laboratorio Environmental Laboratories SAC, empresa que se dedica al rubro ambiental. Este proyecto propone metodologías de análisis mediante cromatografía de gases y el estudio de la configuración más apropiada que incluye el diseño del esquema experimental: cantidad, limpieza y concentración de la muestra, la conexión del inyector con la columna (capilar) del cromatógrafo y el acondicionamiento del detector de Ionización de llama (FID) para obtener en el menor tiempo posible la separación de los componentes de los hidrocarburos totales de petróleo procedentes de Centros Mineros, Petroleros y sectores Industriales, con la mayor resolución y reproducibilidad. Y la determinación de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) mediante el uso Cromatógrafo de Gases acoplado al Espectrómetro de Masas Shimadzu QP-2010 perteneciente al Laboratorio Environmental Laboratories SAC.

II. MARCO TEÓRICO

II.1 HIDROCARBUROS DE PETROLEO

II.1.1 Definición

El término hidrocarburos de petróleo, se usa para describir a un grupo extenso de varios cientos de sustancias químicas derivadas originalmente del petróleo crudo. En este sentido, los hidrocarburos de petróleo son realmente una mezcla de productos químicos compuestos de hidrógeno y carbono [6].

La mayoría de los productos que contienen hidrocarburos de petróleo son inflamables, algunos son líquidos incoloros o de color claro, altamente volátiles; mientras que otros son líquidos espesos de color oscuro o semisólidos de baja volatilidad.

Debido a la demanda de muchos productos derivados del petróleo, como combustibles por ejemplo gasolina, kerosene, diesel, lubricantes, asfaltos, la posibilidad de contaminación ambiental por estos productos es relativamente alta.

II.1.2 Clasificación:

Los hidrocarburos pueden ser agrupados en las siguientes clases: saturados, insaturados y aromáticos [10].

II.1.2.A. Hidrocarburos Saturados

Los hidrocarburos saturados constituyen la principal clase de compuestos existentes en el petróleo y en la mayoría de sus derivados. En su estructura se tienen solo enlaces simples.

- (i) **Alifáticos:** pueden ser lineales y ramificados. Los nombres comunes para estos tipos de compuestos son alcanos e isoalcanos. En la industria del petróleo se conoce a estos compuestos como parafinas.

Las parafinas son uno de los principales constituyentes del crudo y se encuentran en los diferentes productos refinados del petróleo: gasolina, queroseno, diesel, aceites combustibles, etc.

Ejemplo:

Entre los principales compuestos aromáticos se tiene:

- (i) Los alquibencenos, en estos compuestos se tiene como base el anillo aromático unido a un radical alquino, por ejemplo el tolueno.
- (ii) Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's); es un grupo de hidrocarburos que consisten en moléculas que contienen dos o más anillos aromáticos de 6 carbonos, fusionados a través de dos o más átomos de carbono (véase la figura II.1), pero algunos de ellos contienen también anillos de cinco carbonos (como el acenaftileno y el fluoranteno) [11].

Las principales fuentes antropogénicas de mayor contribución a la presencia de PAH's en el entorno son: procesos industriales, calefacciones domésticas, fuentes móviles de emisión (transportes), incineradoras y plantas de generación eléctrica [12].

II.1.2.C.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's)

El estudio científico de los PAH's y sus efectos comenzó en 1775, al atribuirse el cáncer padecido por los limpiadores de chimeneas a la exposición al hollín y la ceniza que suponía su actividad. Investigaciones posteriores sugirieron que los agentes causantes del cáncer eran los PAH's contenidos en el hollín. A lo largo de los años 30 se demostró que algunos de los PAH's presentaban un fuerte potencial cancerígeno, mientras se iniciaba el estudio de propiedades similares en otros [11].

Los PAH's son un grupo de sustancias químicas que se forman y entran al medio ambiente durante la incineración incompleta del carbón, el petróleo, el gas, la quema de madera en los hogares y los gases de los tubos de escape de automóviles y camiones. También pueden entrar a las aguas de superficie a través de las descargas de las plantas industriales y las plantas de tratamiento de aguas residuales y pueden ser liberados a los suelos de los sitios de desechos peligrosos si se escapan de los contenedores de almacenamiento.

Existen más de 100 clases diferentes de PAH's, pero se identifico 03 compuestos aromáticos, los cuales se encuentran dentro de los Hidrocarburos Totales de Petróleo; estos tres compuestos son los siguientes:

- Fenantreno.
- Pireno.
- Ben(a) antraceno

El impacto ambiental más relevante es el ocasionado por la deposición de las partículas emitidas, porque aparte de ocasionar problemas respiratorios y cardiopatías en las personas, altera los ciclos químicos y de nutrientes en los suelos y aguas superficiales [13].

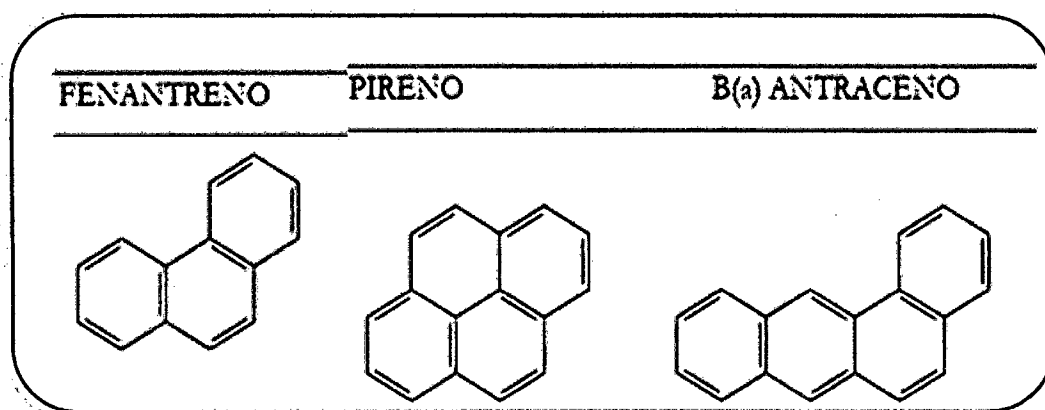


Figura II.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos estudiados en este trabajo [11].

Para más detalles acerca de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos ver Anexo5.

II.1.2.D. Otros compuestos

El petróleo contiene trazas de compuestos orgánicos que no se consideran hidrocarburos, principalmente contienen oxígeno, nitrógeno y azufre. Hay también pequeñas cantidades de compuestos organometálicos y sales inorgánicas. Estos compuestos se concentran en las fracciones pesadas de destilación y en los residuos durante el refinado. Se les denomina frecuentemente a estos como asfaltenos [9].

II.1.3. Propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos

Es de suma importancia conocer las propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos, con el objeto de predecir su destino en los organismos vivos y en el medio ambiente, a continuación se describen algunas de sus propiedades más relevantes [14].

II.1.3.A. Densidad

Los compuesto orgánicos con densidad menor al agua como la gasolina, aceite y el propio petróleo, tienden a formar una capa superficial en el agua y se mueven en dirección del flujo.

Tabla II.1.1 Densidades de algunos Hidrocarburos

Sustancia	Densidad en kg/m ³
agua	1000
aceite	920
gasolina	680
diesel	850

II.1.3.B. Polaridad

Representa la uniformidad de distribución de las cargas eléctricas en una molécula, la mayoría de los hidrocarburos son compuestos no polares.

II.1.3.C. Solubilidad en agua

Al ser los hidrocarburos compuestos no polares, no son solubles en agua, o son muy pocos solubles.

II.1.3.D. Presión de vapor

La permanencia de los hidrocarburos en el agua está determinada por su presión de vapor. La presión de vapor es la tendencia de un líquido o sólido a volatilizarse.

Los crudos ligeros son más volátiles, tienden a ser muy fluidos y se extienden con rapidez en la superficie del agua, por su elevada velocidad de evaporación desprenden un fuerte olor y son normalmente inflamables.

Los crudos más pesados y menos volátiles poseen una gama de velocidades de evaporación y pueden ser inflamables.

II.1.4. Impactos ambientales producidos por los hidrocarburos de petróleo

El impacto ambiental, se puede definir como un grupo de huellas y problemas que deja en el medio ambiente natural una actividad industrial, en este caso, la actividad hidrocarburífera en el Perú.

La contaminación del aire, el agua, el suelo, daños en la flora y en la fauna son claros indicadores de este problema.

Los impactos se dan en todas las fases de la industria minera y petrolera, como son: exploración, perforación, producción, almacenamiento, transporte, procesamiento y distribución de derivados. Cada una de estas fases lleva implícita una serie de procesos y relación directa con la naturaleza y el ser humano y todas son de alto riesgo. El recurso agua, es uno de los elementos más vulnerables a la contaminación por la actividad hidrocarburífera [15].

Sobre la vida marina el impacto producido se agrava por los efectos tóxicos y la impregnación, como resultado de la composición química de los hidrocarburos, así como por la diversidad y variabilidad de los sistemas biológicos y su susceptibilidad a la contaminación.

Para establecer la gravedad de estos impactos ambientales es necesario realizar un muestreo del suelo, agua y especies biológicas y determinar en estas la concentración de contaminantes. A partir de los resultados del muestreo se puede establecer si existe o no algún riesgo de salud por el consumo de especies marinas y si el ecosistema resultó alterado.

Los efectos de los hidrocarburos se manifiestan de diferentes formas, las más importantes se describen a continuación:

II.1.4.A. Contaminación del agua

La contaminación del agua puede provenir de la inapropiada disposición de los desechos sólidos en la fase de perforación exploratoria como lodos de perforación, derrumbes de tierra por la deforestación, desechos generados como basura, aguas negras, que son acarreados a los cuerpos de agua [16].

Al ser mal manejados estos desechos pueden contaminar notablemente ríos, riachuelos y lagunas.

(i) Contaminación de aguas superficiales:

Una de las principales fuentes de contaminación son los vertidos residuales. Los residuos domésticos e industriales son vertidos directamente en las aguas superficiales a través de los sistemas de alcantarillado

(ii) Contaminación de aguas subterráneas:

Uno de los principales peligros de la contaminación es que el agua contaminada puede infiltrarse a las aguas subterráneas.

Este factor representa un potencial perjuicio para el abastecimiento de este recurso, y la posibilidad de afectaciones a la salud.

(iii) La fauna puede verse afectada por varios factores: la persistencia de una mancha de crudo limita el paso de la luz y por tanto reduce la actividad fotosintética de muchas plantas, si la mancha las cubre dificulta también su función reproductora y fijación.

(iv) Alteración física y química de los hábitat naturales (las especies más resistentes toman los espacios dejados por otras especies desaparecidas).

(v) Contaminación en especies de la cadena alimenticia humana, peces, moluscos. (Aunque sobrevivan pueden estar contaminados y por tanto su consumo puede ser perjudicial).

(vi) Pérdida de zonas pesqueras y marisqueras.

Según la Ley No. 28611, en concordancia con el DECRETO SUPREMO N° 037-2008- del MINISTERIO DEL AMBIENTE (MINAM), establece que el límite máximo permisible para las muestras de aguas es de 20mg/L [17].

II.1.5. Efectos de los hidrocarburos en la salud humana

Es conocido que algunos hidrocarburos tienden a acumularse en los organismos a través de las cadenas alimenticias con creciente riesgo de cáncer y de mutagénesis. Por ello los organismos más expuestos son los humanos. Estos contaminantes incluyen el benceno, los fenoles, y a los hidrocarburos policíclicos que son muy peligrosos por sus efectos cancerígenos [18].

Los efectos en la salud humana dependen de muchos factores, estos incluyen:

- Tipo de hidrocarburo al que se encuentra expuesto.
- Tiempo de exposición.
- Cantidad de la sustancia química con la que se está en contacto.

Se conoce muy poco acerca de la toxicidad de muchos de los hidrocarburos del petróleo. Hasta el momento, todo lo que se sabe acerca de los efectos de los hidrocarburos sobre la salud, está basado en estudios de los compuestos o productos de petróleo específicos.

Los compuestos de las diferentes fracciones de hidrocarburos, afectan la salud. Algunos componentes, especialmente los compuestos aromáticos simples, como el benceno, tolueno y xileno (componentes de la gasolina), pueden afectar el sistema nervioso de los seres humanos.

Tabla II.1.2. Afectaciones a la salud [18]

Compuesto	Concentración (ppm)	Tiempo (horas)	Sintomatología	Observaciones
Benceno	100	>3	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Fatiga ✓ Dolor de cabeza ✓ Náuseas ✓ Adormecimiento 	Cuando la exposición cesa, los síntomas desaparecen.
n-hexano	500-2500	>24	<p>Afectación al sistema nervioso central</p> <p>“neuropatía periférica”</p> <p>Característico por pérdida de la sensación en los pies y piernas.</p>	<p>En casos graves Produce parálisis.</p> <p>Exposición al compuesto en el aire.</p>
Gasolina, Diesel, kerosén			<ul style="list-style-type: none"> ✓ Irritación a la garganta y estómago ✓ Depresión del Sistema nervioso ✓ Dificultad al respirar ✓ Neumonía 	Debido a la Ingestión.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha determinado que el benceno es cancerígeno en los seres humanos, produce leucemia. Se considera que otros hidrocarburos por ejemplo el benzo(a) pireno y la gasolina como tal, produce cáncer en los seres humanos [18].

II.1.6. Análisis de Hidrocarburos

Previo a la determinación de hidrocarburos de petróleo se debe llevar a cabo un muestreo, luego la preparación de muestras, que normalmente va a incluir una etapa de extracción y purificación con el fin de obtener un extracto final de hidrocarburos, compatible con la cuantificación.

II.2 METODO DE ANALISIS

Los hidrocarburos totales y derivados de petróleo se analizan básicamente usando el siguiente método:

- ❖ Análisis por cromatografía de gases– FID.

Y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) se analizan por:

- ❖ Espectrometría de Masas (cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas).

II.2.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES

Cromatografía de gases (GC) es una técnica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil ó gas de arrastre de un gas inerte, y a diferencia de la mayoría de los tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna [19].

Existen dos tipos de cromatografía de gases: la cromatografía gas - sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC). La cromatografía gas - líquido tiene gran aplicación en todos los campos de la ciencia y su denominación se abrevia normalmente como cromatografía de gases (GC) y es la técnica que se aplicara para el análisis de hidrocarburos totales de petróleo (TPH).

La cromatografía gas - líquido se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte. El concepto de cromatografía gas - líquido fue enunciado por primera vez, en 1941, por Martin y Synge.

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles. Una fase es estacionaria y la otra móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna que contiene una fase estacionaria distribuida.

Las especies de la muestra experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido más fuertemente eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra [1].

En cromatografía gas-líquido (GC), los dos factores que gobiernan la separación de los constituyentes de una muestra son:

- Solubilidad en la fase estacionaria: cuanto mayor es la solubilidad de un constituyente en la fase estacionaria, éste avanza más lentamente por la columna.
- Volatilidad: cuanto más volátil es la sustancia (o, en otros términos, cuanto mayor es la presión de vapor), mayor es su tendencia de permanecer vaporizada y más rápidamente avanza por el sistema [21].

Para realizar una separación mediante cromatografía de gases, se inyecta una pequeña cantidad de la muestra a separar en una corriente de un gas inerte a elevada temperatura; esta corriente de gas, atraviesa una columna cromatográfica que separará los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (cromatografía gas-líquido). Las sustancias separadas salen de la columna con el gas de arrastre y pasan por un detector; dispositivo que genera una señal eléctrica proporcional a la cantidad del material eluido. El

registro de esta señal en función del tiempo es el cromatograma, en donde las sustancias aparecen como picos con áreas proporcionales a sus masas en función del tiempo, lo que posibilita el análisis cuantitativo (Figura II.2.1).

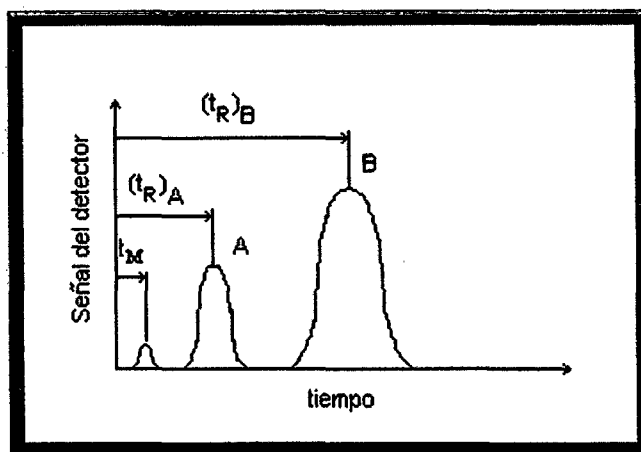


Figura II.2.1 - Ejemplo de un cromatograma de dos componentes [19].

Donde:

➤ **Tiempo de Retención(t_R)**

El tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra para que el pico del analito alcance el detector se denomina tiempo de retención y se le da el símbolo t_R . (Ver figura II.2.1).

➤ **Tiempo Muerto (t_M)**

El tiempo que tarda en eluir un soluto que no interacciona con la fase estacionaria. (Ver figura II.2.1).

II.2.2. Parámetros Fundamentales en Cromatografía de Gases

II.2.2.A. Constante de Distribución ó de reparto.

Los equilibrios de distribución implicados en cromatografía se describen por ecuaciones simples que suponen la transferencia de un analito entre las fases estacionaria y móvil. Así para una especie A.



La constante de este equilibrio K se denomina, constante de distribución y se define como:

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad \text{Ec.1}$$

Donde:

- C_S es la concentración molar de analito en la fase estacionaria.
- C_M es la concentración molar de analito en la fase móvil.

II.2.2.B. Factor de Capacidad

Es un parámetro (k') que se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna. Para una especie A, el factor de capacidad k'_A se define como:

$$k'_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad \text{Ec.2}$$

Donde K_A es la constante de distribución, V_S es el volumen de retención del soluto en la fase estacionaria y V_M es el volumen de retención del soluto en la fase móvil.

También puede ser descrito en términos experimentales los cuales pueden ser tomados de un cromatograma:

$$k'_A = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M} \quad \text{Ec.3}$$

Donde $(t_R)_A$ es el tiempo de retención del componente A y t_M es el tiempo muerto obtenido para una especie no retenida. Ver figura II.2.2.

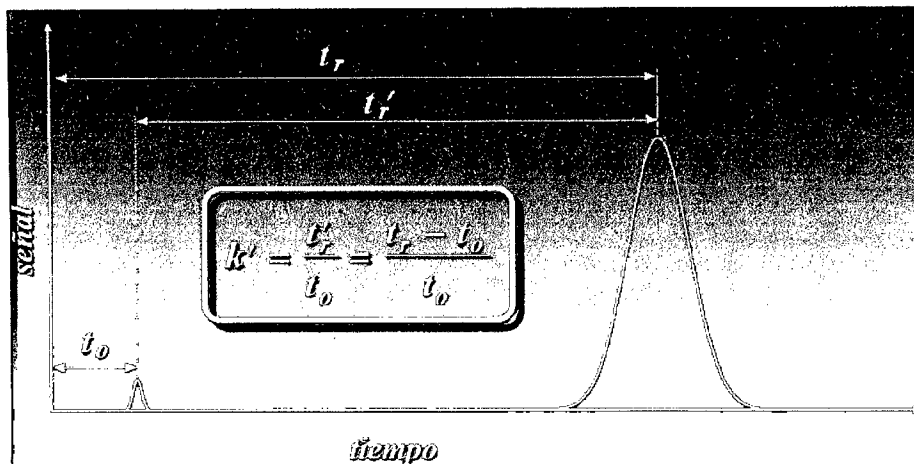


Figura II.2.2 Factor de Capacidad en cromatografía de gases [20].

Lo cual el factor de capacidad indica:

- Medida de la retención del soluto.
- Que tan lejos del tiempo muerto eluye este.

II.2.2.C. Factor de Selectividad

El factor de capacidad α de una columna, como su nombre lo indica, es un término que define que tan selectiva es una columna para separar dos picos. Es de hacer notar, que la columna puede ser selectiva a una separación, que se identifica por un valor alto de este factor, pero si no se considera la mejora de los parámetros que pueden afectar el ancho de un pico, aun así no se lograría la separación de los mismos.

Entonces el factor de selectividad de una columna para dos especies A y B se define como:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad \text{Ec.4}$$

Donde: k'_B es el factor de capacidad del compuesto B, que es el más retenido y k'_A es el factor de capacidad del compuesto A, que es el menos retenido.

Con esta definición α siempre es mayor que la unidad.

En términos tomados a partir de un cromatograma α se puede calcular como sigue: (ver figura II.2.3)

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad \text{Ec.5}$$

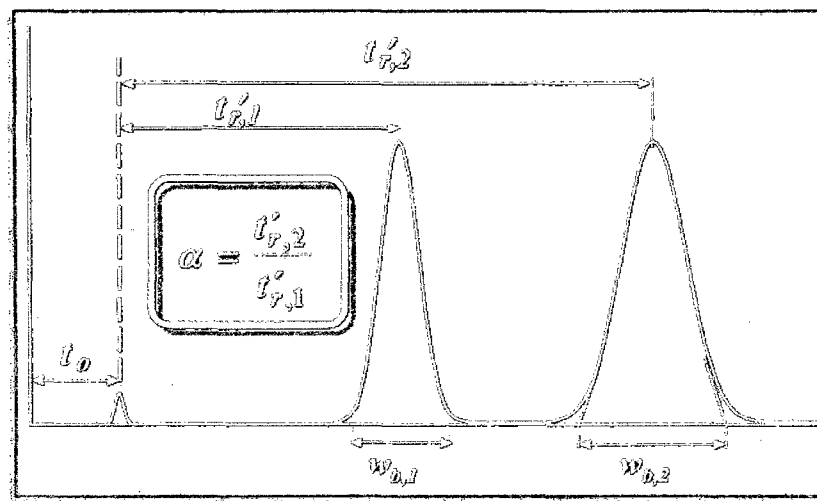


Figura II.2.3. Factor de Selectividad en cromatografía de gases [20].

Por lo cual la Selectividad:

- Muestra las diferencias de afinidad por los solutos de las fases involucradas.
- Indica el potencial de separación de esos solutos en el sistema, pero no mide la separación real.

II.2.2.D. Eficiencia de una Columna.

Como se dijo, si no se toma en cuenta los factores que afectan el ancho de un pico para la separación cromatografía no se podría lograr una buena separación aun cuando se tenga un factor de selectividad alto para estos picos en una columna particular.

Es decir que mientras mayor es la capacidad de la columna de producir picos más estrechos mayor es su eficiencia [8].

La anchura de una banda aumenta a medida que se mueve a través de la columna, debido a que cuanto más tiempo transcurre mayor es la dispersión que puede tener lugar. Por ello la anchura de la zona está relacionada directamente con el tiempo de residencia en la columna, e inversamente con la velocidad a la que fluye la fase móvil.

Según la Teoría de Platos, una columna cromatográfica está constituida por una serie de platos que contiene la fase estacionaria. Supone que el volumen de fase estacionaria en cada plato es constante; que el volumen de fase móvil es constante de plato a plato; y que en cada uno de ellos las dos fases están en equilibrio, y el valor del coeficiente de distribución es constante e independiente de la concentración del soluto [19]. Según esta teoría, la separación se produce como consecuencia de estas transferencias por lo que la eficacia de la columna dependerá del número de equilibrios que tiene lugar en el interior de la columna durante la elución, es decir, depende del número de platos teóricos (N) que tenga la columna. Cuanto más estrecho sea el plato teórico, mayor número de ellos habrá para una longitud L de columna, por tanto, la eficacia de la columna será inversamente proporcional a la altura equivalente del plato teórico (AEPT) y directamente proporcional al número de platos [22]. Por lo cual se utilizan dos términos afines con frecuencia como medida cuantitativa de la eficacia de una columna cromatográfica: (1) la altura equivalente de plato teórico o H y (2) el número de platos teóricos N . Los dos están relacionados por la ecuación: (ver figura II.2.4.).

$$\boxed{AEPT = H = \frac{L}{N}} \quad \text{Ec.6}$$

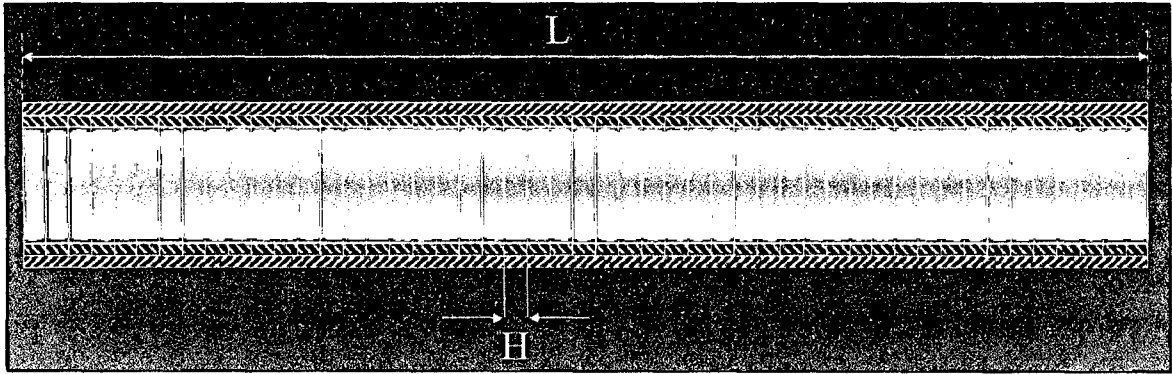


Figura II.2.4. Relación de la altura y la longitud en la columna cromatográfica [8].

Donde:

- H=altura equivalente a un plato teórico.
- L = Longitud de la columna (cm).

La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuando mayor es el número de platos, y cuando menor es la altura de plato.

La evaluación experimental de H y N se puede realizar a partir de las siguientes ecuaciones:

$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2} \quad \text{Ec.7}$$

Donde: L es la longitud de la columna, W es el ancho del pico a considerar y t_R es su tiempo de retención.

La ecuación final que rige en esta teoría es: (ver figura II.2.3.4)

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \quad \text{Ec. 8}$$

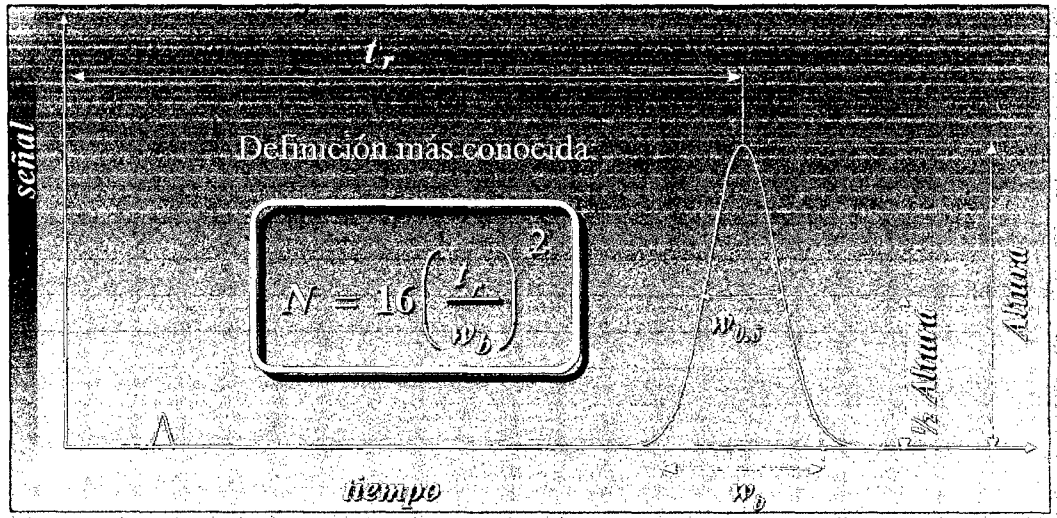


Figura II.2.5. Determinación del plato teórico en la columna cromatográfica [20].

Por lo tanto:

- ✓ Entre mayor sea el numero de platos teóricos se logra mejor separación.
- ✓ Para una misma longitud se logra mayor poder de separación con una menor H.

La elución implica la purificación de una especie por lavado en una columna mediante la adición continua (en GC es por la aplicación de presión) de fase móvil [28]. Cuando los solutos viajan a través de la columna los picos se ensanchan y más aun cuanto más larga es la columna, por tanto para determinar si una separación es posible tenemos que tener en cuenta dos factores:

1. La diferencia en la velocidad de migración de los solutos, que determina la posición de los picos en el cromatograma.
2. La velocidad finita que tarda en alcanzarse el equilibrio en cada plato teórico, que traerá el ensanchamiento en las bandas del cromatograma.

La principal desventaja de la Teoría de los Platos Teóricos es la falta de conexión entre la eficiencia de la columna cromatográfica, el tamaño de la partícula, la difusión, la velocidad de flujo y la temperatura; otra desventaja es que utiliza un modelo basado en muchas

suposiciones (fases inmóviles, ausencia de difusiones por desplazamiento de materia, entre otros) [20].

La Teoría de Van Deemter, propuesta en 1956, considera el proceso cromatográfico en función de los factores cinéticos que intervienen en él, por lo que complementa bastante bien la teoría en la que se sustenta la eficacia del proceso de separación, la cual viene dada por dos factores [8]:

1. La diferencia de la velocidad de migración de los solutos de la mezcla, que origina la separación física entre los picos.
2. La velocidad que tarda en alcanzarse el equilibrio en cada plato teórico que traerá consigo un ensanchamiento del pico cromatográfico.

El ensanchamiento de la banda depende de la velocidad de transferencia finita del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria en cada plato teórico. Este ensanchamiento se debe a un avance diferente de las moléculas de un mismo soluto a través de la columna. No todas las moléculas de un mismo soluto fluyen de igual forma en el mismo instante de tiempo, es decir, no presentan un comportamiento ideal [19]. Este comportamiento no ideal, se debe a tres factores:

- ❖ Difusión en remolino.
- ❖ Difusión longitudinal.
- ❖ Resistencia a la transferencia de materia.

Podemos agrupar estos efectos en una ecuación simple, que es la **ecuación de Van Deemter**:

$$H = A + \frac{B}{u} + C_S u + C_M u \quad \text{Ec.9}$$

Donde:

- ✓ H es la altura de plato expresada en centímetros y u es la velocidad lineal de la fase móvil expresada en centímetros por segundo.

En esta ecuación se evalúan varios términos que pueden contribuir al ensanchamiento de una banda los cuales se pueden interpretar como sigue:

El termino **A**, igual a $p 2\lambda d$ y atribuido a la **difusión en remolino**, representa el efecto de trayecto múltiple de la fase móvil a través de una columna empacada. Incorpora la densidad λ del empaque y el promedio del diámetro de partícula, d_p Para las columnas capilares sin relleno este término es cero [20].

La **difusión longitudinal (B/u)**, es una causa del ensanchamiento de banda por las que los analitos difunden desde la zona más concentrada del centro de la banda hacia las regiones más diluidas por delante y por detrás del centro de la banda, es decir, en el mismo sentido y en el sentido opuesto a la dirección del flujo. El termino **B**, $M 2\gamma D$, expresa la tortuosidad γ de los canales en la columna empacada y el coeficiente de difusión molecular del soluto en la fase móvil [20].

El termino **C** esta dado por $(8/\pi^2) [k / (1+k)^2] (2d_f^2 / D_E)$. Refleja la resistencia a la transferencia de masa entre la fase móvil y la estacionaria, y dentro de la propia fase estacionaria, en donde k es el factor de capacidad, d_f es el espesor de la película de la fase estacionaria y D_E es el coeficiente de difusión del soluto en la fase estacionaria.

En la Figura II.2.6, se muestra la curva de Van Deemter donde se tiene 3 tipos de gases para elegir el gas portador adecuado.

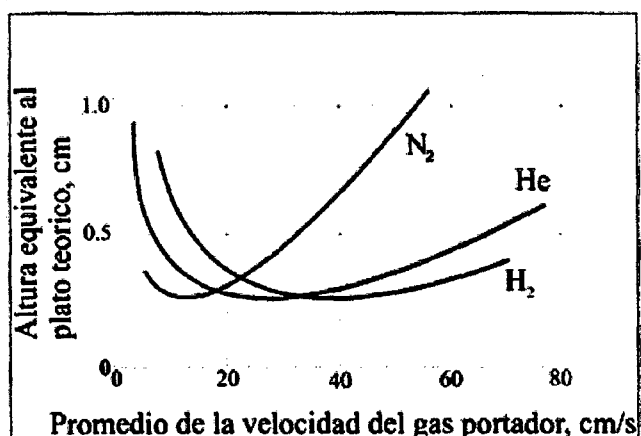


Figura II.2.6. Gráfica de Van Deemter [8].

En la Figura II.2.7 se observa 3 cromatogramas en función de la selectividad y la eficiencia.

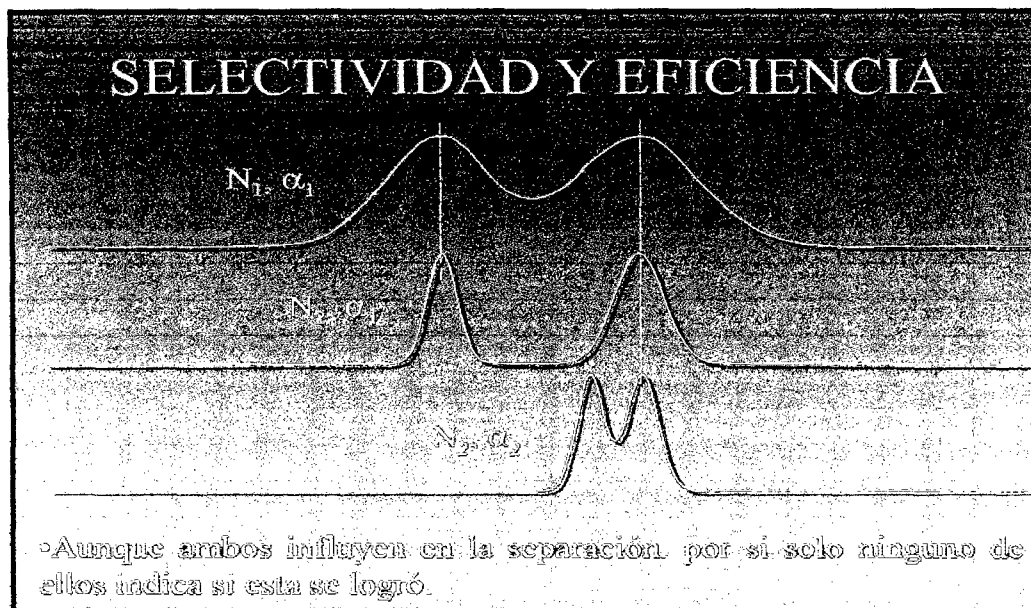


Figura II.2.7. Selectividad y Eficiencia de una columna cromatográfica [8].

II.2.2.E. Resolución de una Columna

La resolución de una columna (R_s) constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos, en este término si se toma en cuenta el ensanchamiento de los picos, así que la magnitud de este valor si permite asegurar la separación de dos picos.

Según la gráfica Figura II.2.8 la Resolución de la columna se representa de la siguiente manera:

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad \text{Ec.10}$$

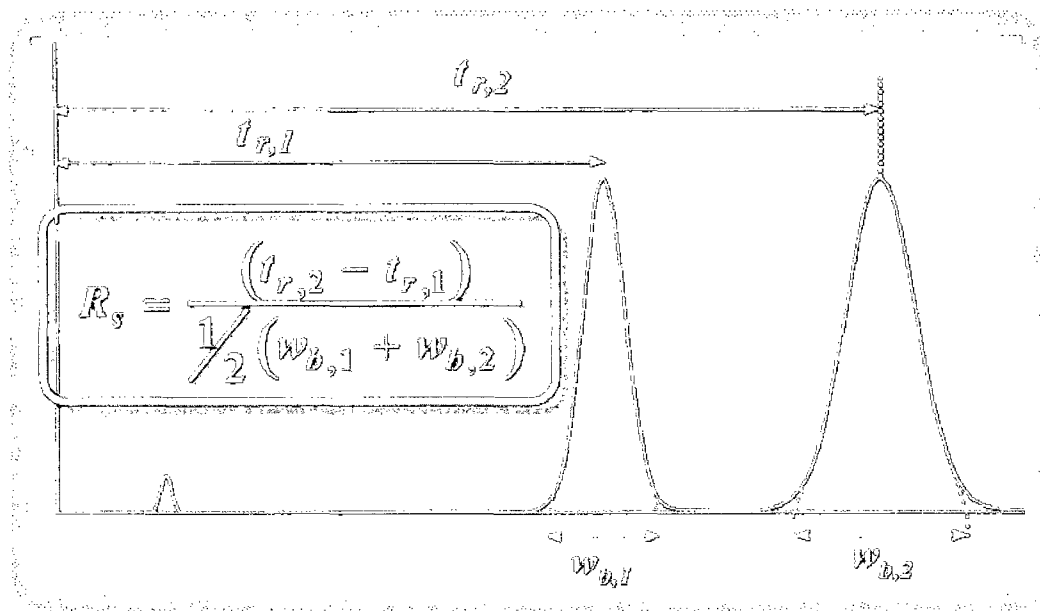


Figura II.2.8 Grafica de la Resolución de la columna cromatográfica [20].

Por lo tanto la resolución expresada en términos de la retención, selectividad y eficiencia de la columna está dada por:

$$R_s = \underbrace{\left[\frac{k'}{1+k'} \right]}_{\text{retención}} \underbrace{\left[\frac{\alpha-1}{\alpha} \right]}_{\text{selectividad}} \underbrace{\left[\frac{\sqrt{N}}{4} \right]}_{\text{eficiencia}} \quad \text{Ec.11}$$

Según la Figura II.2.9 se observa los parámetros a considerar para obtener una buena resolución:



Figura II.2.9 Parámetros que contribuyen a la Resolución cromatográfica [8].

De la figura II.2.9:

✚ Resolución y Retención

- ✓ Si los solutos no se retienen no hay separación.
- ✓ Conforme aumenta la retención (t_r'/t_0) la separación mejora.
- ✓ Si los solutos se retienen demasiado, solo se tarda más el análisis sin mejorar la separación.

✚ Resolución y Selectividad

- ✓ A mayor selectividad mejor separación.
- ✓ En cromatografía de gases la selectividad depende solo de las interacciones específicas de la fase estacionaria con los solutos.
- ✓ Para mejorar la selectividad se necesita cambiar la columna por otra con una fase estacionaria diferente.

✚ Resolución y Eficiencia

- ✓ A mayor número de platos teóricos, mejor separación.
- ✓ La separación mejora apreciablemente solo si el aumento en N es de varios órdenes de magnitud.
- ✓ Los aumentos pequeños no son importantes, p. ej. duplicar el largo de columna duplica el tiempo de análisis y solo mejora en 40% la resolución.

II.2.3. PARTES DE UN SISTEMA CROMATOGRAFICO

Los componentes fundamentales de un cromatógrafo de gases, son:

- Fuente de gas portador.
- Sistema de inyección.
- Horno y columna cromatográfica.
- Sistema de detección.
- Sistema de registro.

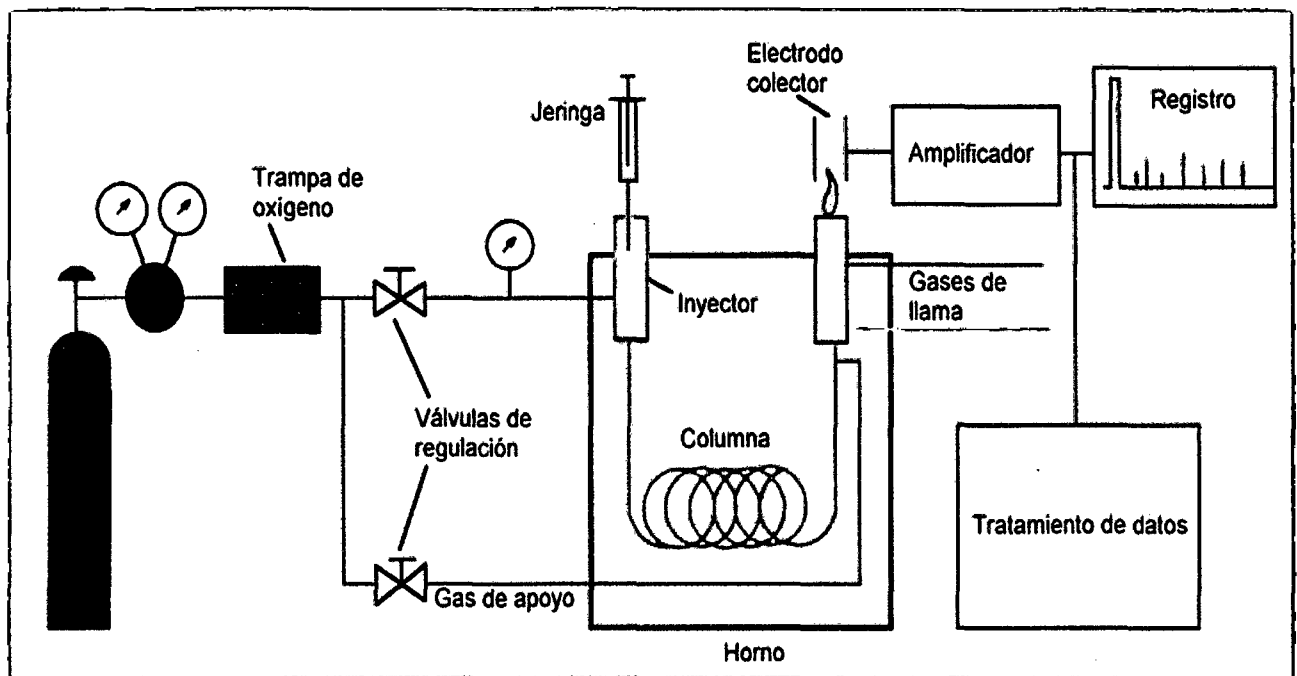


Figura II.2.10. Esquema del Cromatógrafo de Gases [22].

II.2.3.A. Fuente de Gas Portador

Generalmente se emplean gases como el helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono, la elección del gas depende del tipo de detector que sea empleado y además el flujo del gas de arrastre debe ser controlado y constante durante el análisis [19].

El gas portador cumple básicamente con dos propósitos

- Transportar los componentes de la muestra.
- Crear una matriz adecuada para el detector.

Un gas portador debe cumplir las siguientes condiciones:

- Debe ser puro e inerte para evitar interacciones (tanto con la muestra como con la fase estacionaria).
- Fácilmente disponible y puro.
- Económico.
- Adecuado al detector a utilizar.

Las **interacciones entre las moléculas** de los gases, a diferencia de los líquidos, suelen ser pequeñas. Por otra parte, los gases suelen tener poca capacidad para desalojar las moléculas de soluto no volátiles fijadas a la fase estacionaria (ya sea ésta sólida o líquida). Por ello, en GC, la fase móvil (gas portador) no interacciona con las moléculas de analito, siendo su función únicamente el transporte del analito a través de la columna [22].

La **elección de la fase móvil** se hace normalmente en orden al coste, disponibilidad e inercia química, así como también en función del detector utilizado y, ocasionalmente, en cuanto a la eficacia de la separación. En este sentido, con nitrógeno suelen obtenerse separaciones más eficaces que con hidrógeno o helio, lo cual puede ser debido a su menor coeficiente de difusión y, consecuentemente, menor valor del término **B** de la ecuación de Van Deemter (ver Ec.9). Sin embargo, para adquirir esa eficacia se requieren bajas velocidades de flujo, lo cual va en detrimento del tiempo necesario para el análisis. Por este motivo, en ocasiones, resulta preferible utilizar hidrógeno o helio para las velocidades óptimas más elevadas, aún a costa de sacrificar la eficacia. Sin embargo, el empleo de hidrógeno presenta otros problemas, ya que es altamente inflamable, puede formar mezclas explosivas con el aire y a veces puede reaccionar con los componentes de la muestra para originar "artefactos" hidrogenados.

Un factor muy importante en las separaciones por cromatografía de gases es el **ajuste del caudal**, ya que este condiciona la velocidad de la separación. Normalmente los caudales se

controlan mediante un regulador de presión de dos niveles, colocado en la botella del gas, y algún tipo de regulador de presión instalado en el cromatógrafo [24].

Al margen del efecto que la naturaleza del gas portador puede ejercer sobre la altura de plato, la elección de uno u otro tipo de gas, estará determinada fundamentalmente por el sistema de detección utilizado. Como fuentes de gas portador se suelen utilizar cilindros de gas comprimido de elevada pureza, capaces de suministrar una presión de gas adecuada y constante; es de hacer notar que, en muchos casos, es necesario eliminar las trazas de impurezas que pueda contener el gas (O_2 y H_2O fundamentalmente) que pueden afectar al sistema cromatográfico, por medio de filtros adecuados. El control de la velocidad del gas portador a través de la columna, se realiza por medio de válvulas que suministran un caudal constante (columnas empaquetadas) o que mantienen constante la presión en cabeza de columna (sistemas capilares).

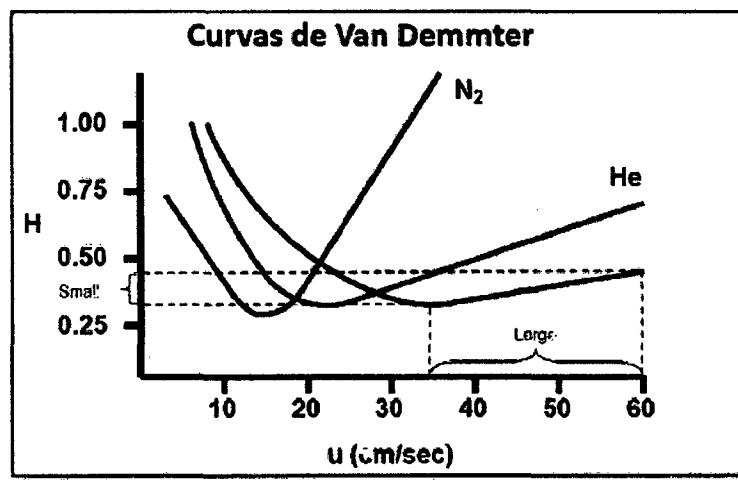


Figura II.2.11. Curvas para tres gases portadores de uso habitual [19].

II.2.3.B Sistema de inyección ó introducción de la muestra

El sistema de inyección de un cromatógrafo es un punto extremadamente crítico, y la utilización de una técnica de inyección inadecuada o una mala elección del sistema de inyección pueden echar a perder completamente la capacidad de separación de una

columna. En esencia, los dispositivos de inyección de muestras para cromatografía de gases tienen la misión de vaporizar la muestra a analizar e incorporarla a la corriente de gas portador que se dirige hacia la columna [23].

La vaporización e introducción de las muestras en el sistema, debe realizarse cumpliendo una serie de requisitos:

1. La vaporización de la muestra debe ser lo más rápida posible.
2. La vaporización debe realizarse sin discriminar ningún componente de la muestra.
3. La muestra debe llegar a la columna como una banda lo más fina posible.
4. La inyección debe ser rápida para evitar el ensanchamiento de los picos.

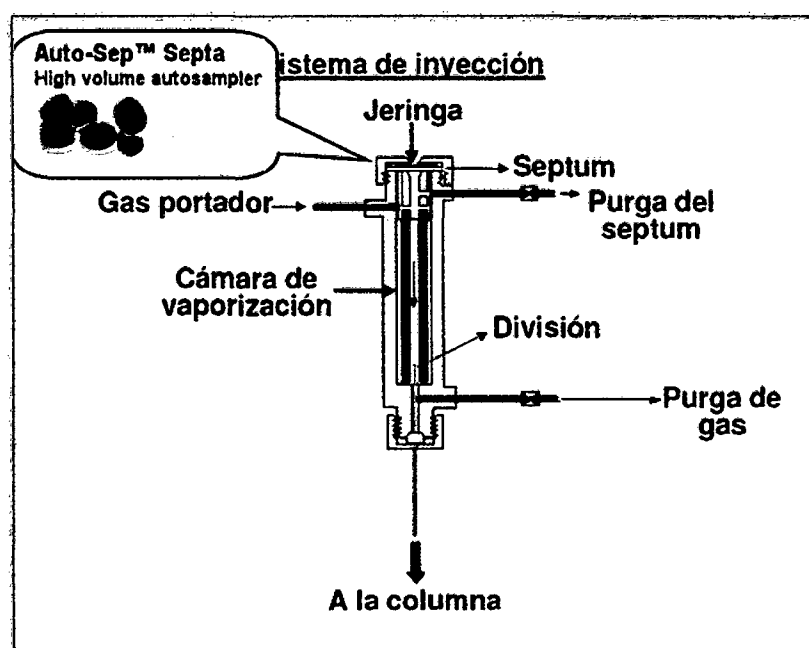


Figura II.2.12 Esquema de Sistema de Inyección [20].

Existen muchas técnicas de inyección para columnas capilares y de entre ellas, se comentarán a continuación las dos técnicas más utilizadas:

- ✦ Inyección Split (inyección con división).
- ✦ Inyección Splitless (inyección sin división).

II.2.3.B.1. Inyección Split (con división de flujo)

- ❖ Es usado para muestras de concentración elevada, dado que sólo una cierta cantidad de muestra inyectada llega a la columna (porque ésta "se divide" antes de entrar; una parte entra a la columna, otra se expulsa a través de una válvula, Split vent.).
- ❖ Con Split los picos de los cromatogramas salen más estilizados y más limpios, esto es porque si en la muestra el analito es mayoritario, el resto de componentes (suciedad, interferencias, etc.) se ven notablemente reducidos.[25]

Los inyectores de este tipo presentan dos inconvenientes:

- ❖ La división de la muestra da lugar a que las cantidades de analito que son separadas y llegan al detector sean muy pequeñas, por lo que los límites de detección aumentan bastante, lo que es un gran inconveniente en el momento de realizar análisis de trazas.
- ❖ Los inyectores de "split" pueden en algunos casos dar lugar a discriminación entre los componentes de la muestra. Dado que puede provocar discriminación de los componentes de mayor punto de ebullición y no siempre puede ser utilizado con fines cuantitativos [26].

Mediante las siguientes graficas describiremos el comportamiento de la muestra en la inyección tipo Split:

- ❖ Para los procesos de preinyección, inyección, vaporización y mezcla muestra/gas e introducción de la muestra a la columna los flujos son constantes en todos los procesos.
- ❖ La vaporización (figura II.2.15) tiene lugar cuando se transfiere suficiente energía térmica a la muestra, esto puede ocurrir en el gas portador, pero es más probable durante el contacto con una superficie sólida, como el láiner ó el medio de mezcla.
- ❖ Al fondo del puerto de inyección (ver figura II.2.16), una pequeña parte de esta mezcla se transfiere a la columna, mientras el exceso de la mezcla salga del cromatógrafo por la salida de Split.

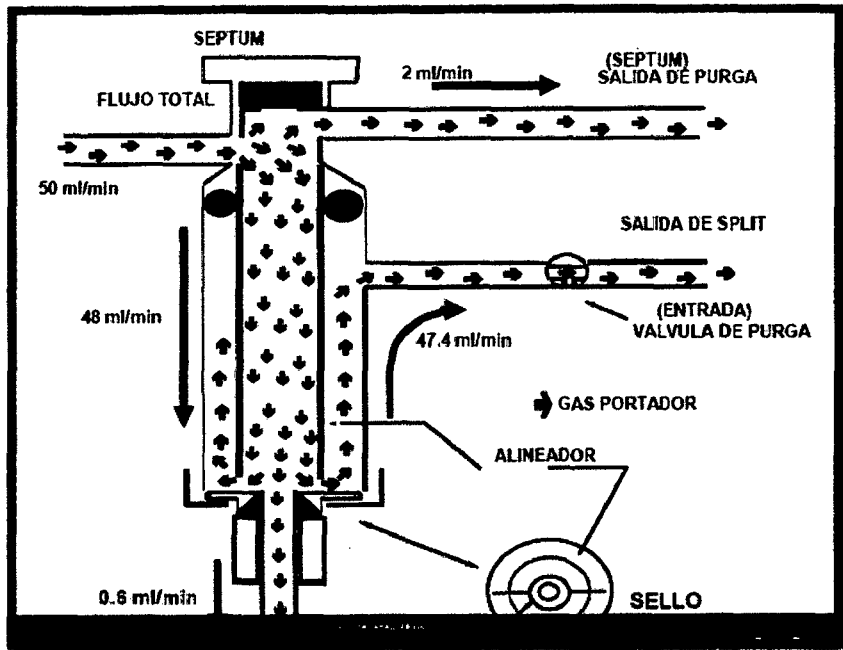


Figura II.2.13 Preinyección de la muestra

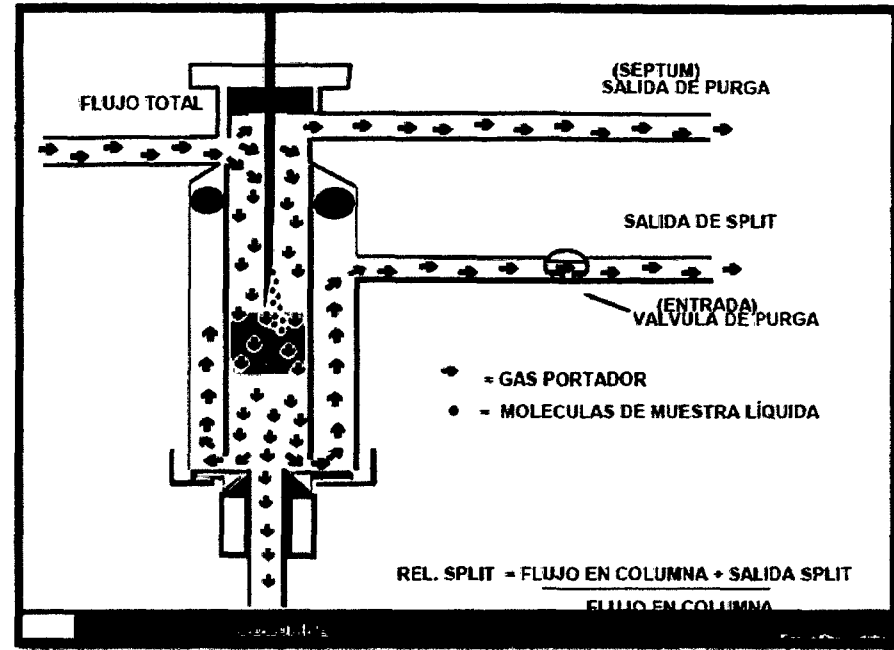


Figura II.2.14. Inyección de la muestra

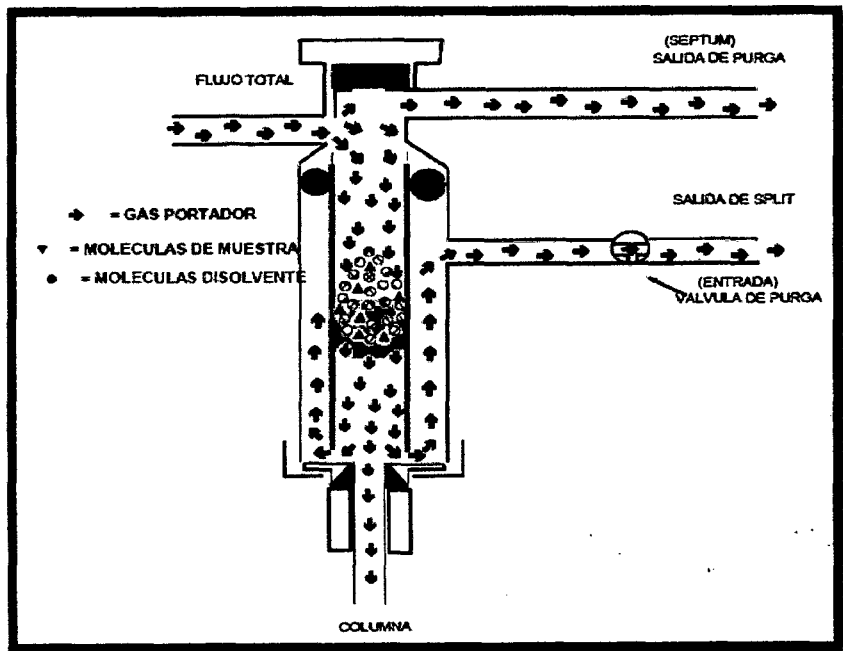


Figura II.2.15. Vaporización de la muestra

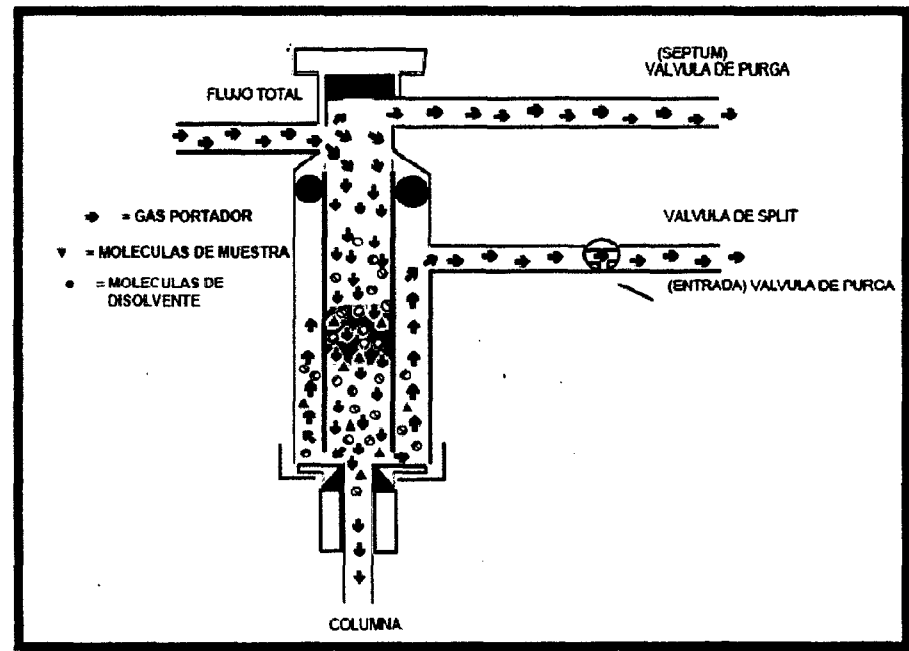


Figura II.2.16 Mezcla muestra/gas

II.2.3.B.2. Inyección Splitless (sin división de flujo)

- ❖ Es usado para muestras de concentración baja (trazas) o diluidas.
- ❖ La válvula de purga está cerrada durante la inyección (no hay flujo en la válvula de Split)
- ❖ En un tiempo específico después de la inyección, la válvula de purga se abre para eliminar vapores remanentes en el inlet (lainer) [26].

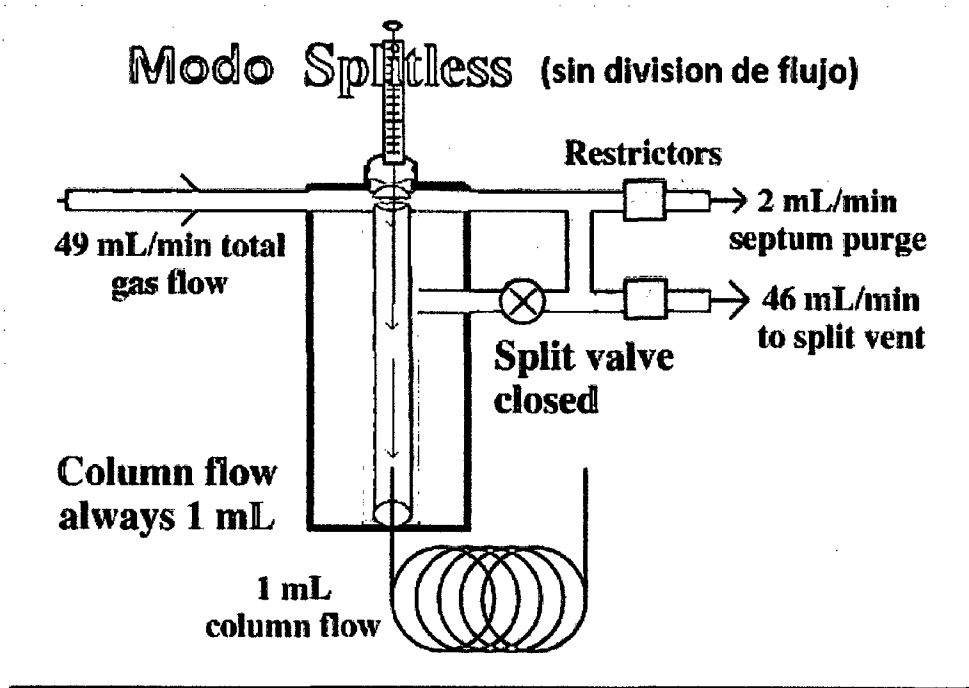


Figura II.2.17 Esquema de un inyector splitless [20].

II.2.4. Horno y columna cromatográfica

Es la parte del sistema cromatográfico que proporciona la temperatura adecuada para llevar a cabo la separación de los analitos. La temperatura del horno de columna debe de tener una precisión de $\pm 0,1$ °C. La temperatura del horno depende del tipo de analito y de la columna que se está usando. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido.

La temperatura es una variable importante en cromatografía analítica, siendo necesario su control preciso en orden a obtener resultados reproducibles [27].

II.2.4.1 Cromatografía isothermal

La temperatura se mantiene constante durante el proceso cromatográfico, muy sencillo y fácil de implementar, pero puede dar a lugar al problema de elusión en el cual al emplear altas temperaturas no se logran separar todos los componentes de una mezcla (sí es lo que se desea), y al bajar la temperatura tal vez se logren separar pero en un tiempo muy grande y produciendo picos anchos.

Para evitar los inconvenientes anteriormente mencionados suele emplearse una **programación de temperatura**, aumentando ésta, linealmente o por etapas, mientras se realiza la separación (También puede modificarse el caudal de gas portador, habiéndose desarrollado técnicas de programación de esta variable e incluso una programación mixta de temperatura y caudal). [27]

II.3.3.2 Cromatografía con temperatura programada

La temperatura se varía siguiendo un programa (rampa) de calentamiento, se emplea normalmente para evitar el problema general de elusión y tratando de separar todos los componentes de una mezcla.

En la figura 11.4. Se muestran los cromatogramas de una mezcla de hidrocarburos operando en condiciones isotermas (fig. II.2.18.a,b) y a temperatura programada (fig. II.2.18.c.)

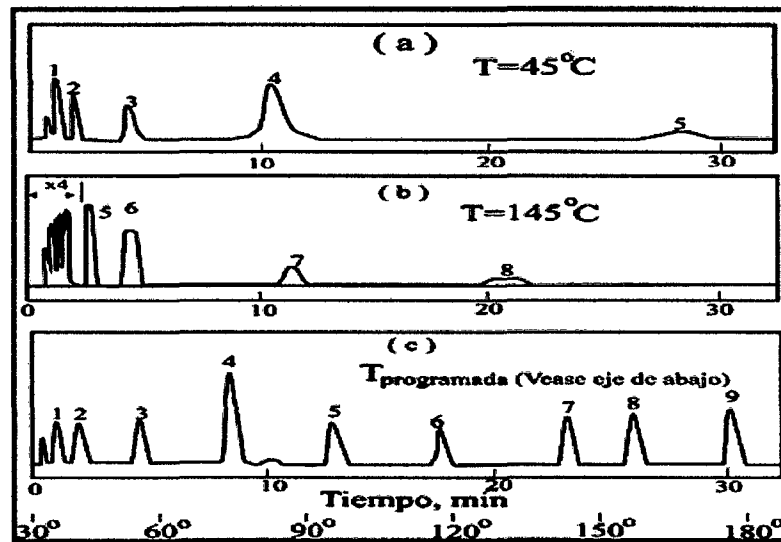


Figura II.2.18. Efecto de la temperatura en un tipo de muestra volátil. a) Isotérmica a 45°C. b) Isotérmica a 145°C. c) Programada de 30°C a 180°C [10].

La columna constituye la parte esencial del sistema cromatográfico y de la que depende el éxito o el fracaso de los análisis. En ella está contenida la fase estacionaria, que determina la selectividad y la eficacia de las separaciones [29]. Es el lugar donde ocurre la separación. Se dice que es el corazón de un cromatógrafo.

Tipos de columnas:

Tabla II.2.1 Tipos de columnas [19].

Tipo de columna	Material de construcción	Diámetro Interior	Longitud	Observación	Clasificación	Detalle
Empacadas	-Acero inoxidable, -Níquel, o -Vidrio	1,6mm - 9mm	< 3m	se rellenan de un material adsorbente adecuado a las sustancias a separar		
Capilares	-Sílice fundida	0,32mm 0,25 mm 0,53mm	> a 20m	Existen dos tipos de columnas capilares	Empacadas con partículas sólidas ocupando el total del diámetro de la columna Tubulares abiertas, con trayectoria para el flujo abierta y sin restricción por el centro de la columnas	Se clasifican en: WCOT (pared recubierta), SCOT (soporte recubierto).

Factores que Afectan la Eficiencia de una Columna

- Longitud de la Columna
- Diámetro de la Columna (1/4", 1/8", 1/16" de diámetro externo)
- Tamaño de las partículas del relleno
- Naturaleza de las fases
- Cantidad de fase estacionaria
- Temperatura de la columna
- Velocidad del gas portador
- Cantidad de muestra inyectada
- Material del cual está elaborada la columna

Para más detalles en fases estacionarias, columnas y detectores ver en el anexo 4.

II.2.5 Detectores

Un detector es un dispositivo para revelar la presencia de las sustancias eluidas a la salida de la columna cromatográfica. Podemos expresar que el detector son los "ojos" de un cromatógrafo.

En cromatografía un detector funciona comparando una propiedad física entre el gas portador puro y el mismo gas portador llevando cada uno de los componentes que previamente se han separado en la columna, esta acción se traduce en una señal tipo eléctrica, que posteriormente se amplificará mediante un registrador gráfico ó integrador permitiendo indicar el momento que salen de la columna los componentes [26].

Principios de los detectores:

- Producen una señal eléctrica estable (línea de base) cuando el gas portador puro está en el detector.
- Producen una señal diferente cuando diferentes analitos pasan por el detector.

Durante el desarrollo de la cromatografía de gases se han investigado y utilizado docenas de detectores, pero todos requieren ciertas características:

- ❖ Sensibilidad: Es necesario que pueda determinar con precisión cuándo sale analito y cuando sale sólo el gas portador. Tienen sensibilidades entre 10^{-8} y 10^{-15} g/s de analito.
- ❖ Respuesta lineal al analito con un rango de varios órdenes de magnitud.
- ❖ Tiempo de respuesta corto, independiente del caudal de salida.
- ❖ Intervalo de temperatura de trabajo amplio, por ejemplo desde temperatura ambiente hasta unos $350-400$ °C, temperaturas típicas trabajo.
- ❖ Estabilidad y reproducibilidad, es decir, a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales.

Existen varios tipos de detectores, pero en dicho proyecto se usó el detector de ionización de flama (FID).

En cromatografía de gases, el detector de ionización de flama (FID) es uno de los detectores más extensamente utilizados y, por lo general, uno de los más aplicables.

La mayoría de los compuestos orgánicos, cuando se pirolizan a la temperatura de una flama de hidrógeno/aire, producen iones y electrones que pueden conducir la electricidad a través de la flama. Entre el extremo del quemador y un electrodo colector situado por encima de la flama, se aplica una diferencia de potencial de unos pocos cientos de voltios, y para la medición de la corriente que resulta (de unos 10-12A) se utiliza un amplificador operacional de alta impedancia [30].

La ionización en la flama de los compuestos que contienen carbono no es un proceso bien establecido, aunque se observa que el número de iones que se produce es aproximadamente igual al de átomos de carbono transformados en la flama. El detector de ionización de flama debido a que es un detector que responde al número de átomos de carbono que entra en el detector por unidad de tiempo, es un detector sensible a la masa, más que un sistema sensible a la concentración. En consecuencia, este detector tiene la ventaja de que los cambios en el caudal de la fase móvil tienen poco efecto sobre la respuesta del detector [26].

Grupos funcionales, tales como carbonilo, alcohol, halógeno y amina, originan en la flama pocos iones o prácticamente ninguno. Además, el detector es insensible a los gases no combustibles como H_2O , CO_2 , SO_2 , y NO_x . Esas propiedades hacen del detector de ionización de flama uno de los detectores generales más utilizados para el análisis de la mayoría de compuestos orgánicos, incluyendo aquellos que están contaminados con agua y con óxidos de nitrógeno y de azufre.

El detector de ionización de flama posee una elevada sensibilidad (del orden de 10^{-13} g/s), un gran intervalo lineal de respuesta (de 10^7), y un bajo ruido. Por lo general, es resistente y fácil de utilizar. Una desventaja del detector de ionización de flama es que se trata de un detector destructivo de la muestra [28].

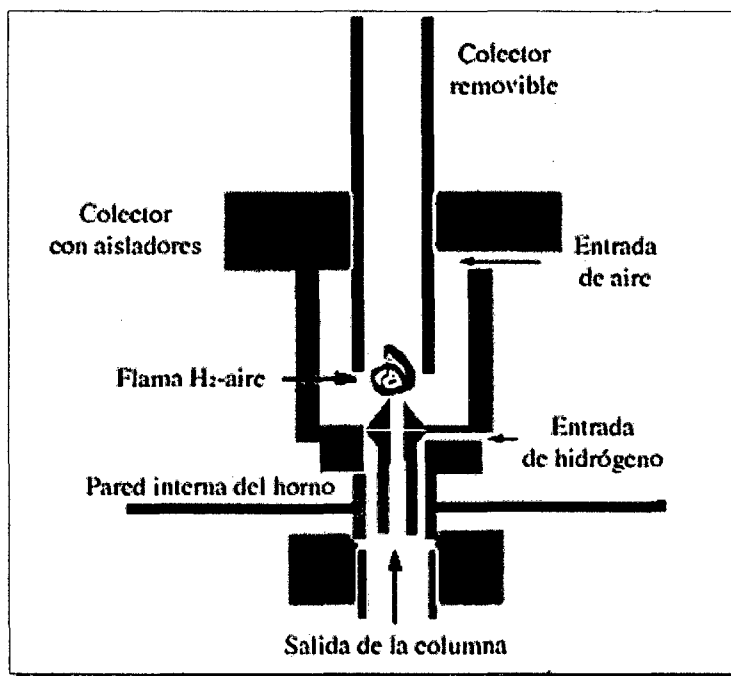


Fig. II.2.19. Detector de ionización de flama [26]

Respuesta del FID:

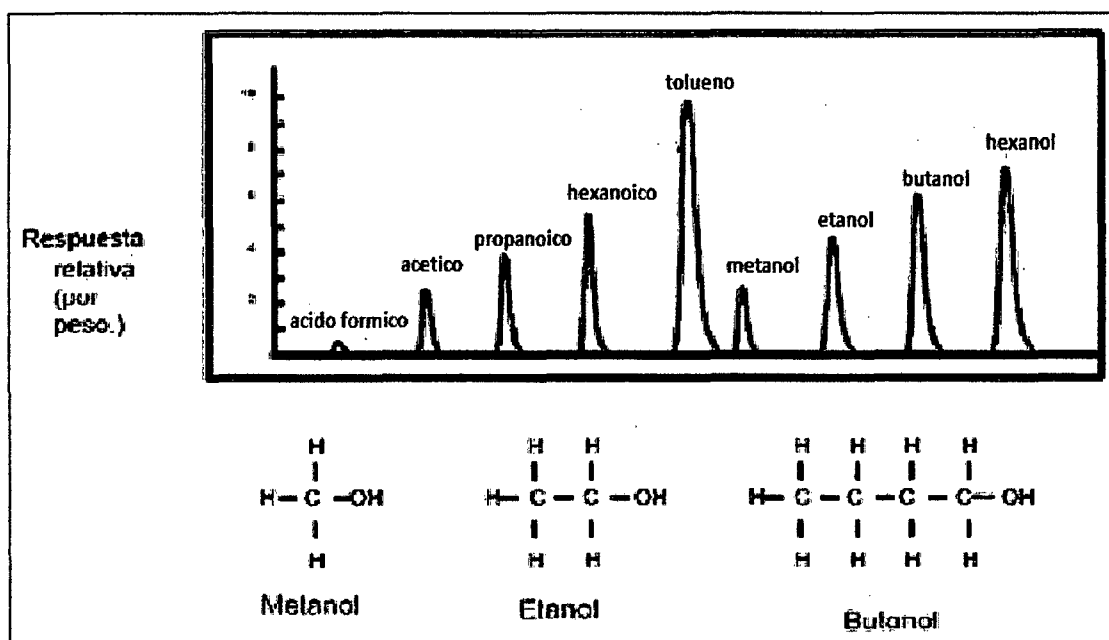


Fig. II.2.20 Respuesta del detector FID [19].

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1 INTRODUCCIÓN

El procedimiento de análisis que se toma como referencia, para la determinación de los hidrocarburos totales de petróleo C10-C40, es el método EPA 8015C [6].

Para el tratamiento de la muestra, previas a la lectura cromatográfica; consisten en la extracción, concentración y purificación de la muestra, basado en el método 3510C [31], para muestras de aguas y el método EPA 3540C [32], para muestras de suelo, y el proceso de limpieza [33,34,35]. La cuantificación y determinación cromatográfica de las muestras a analizar, se realizó mediante un cromatógrafo de gases (GC). Además, la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (fenantreno, pireno y ben(a) antraceno) presentes en la muestra analizadas se determinó mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS Shimadzu QP 2010).

III.2 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

III.2.1 Materiales

- Pera de separación de 2 litros, con llave de paso de politetrafluoroetileno (PTFE).
- Extractor Soxhlet – diámetro interno 40 mm, con frasco de 500 mL.
- Balones de 250mL.
- Vasos de precipitación de 50mL.
- Papel Filtro cualitativo N°41.
- Embudos de Vidrio.
- Viales para Cromatografía de 2mL y 7mL.
- Probetas de vidrio de 50mL.
- Columna de secado - columna cromatográfica de Pyrex® de 10 mm ID con lana de vidrio Pyrex, en la base y con llave de paso de PTFE.

NOTA: Utilizar un pequeño tapón de lana de vidrio Pyrex® para mantener el adsorbente. Lavar previamente el tapón de lana de vidrio con 50 mL de acetona seguido por 50 mL de solvente de elusión antes de empacar la columna con el adsorbente.

➤ Aparato Kuderna-Danish (K-D).

- Tubo del concentrador - 10-mL, graduado (Kontes K-570050-1025 o equivalente). Un tapón de vidrio esmerilado se usa para prevenir la evaporación de los extractos.
- Frasco de evaporación - 500-mL (Kontes K-570001-500 o equivalente). Fijado al tubo del concentrador con resortes, las abrazaderas, o equivalente.
- Columna de Snyder - macro de tres bolas (Kontes K-503000-0121 o equivalente).
- Resortes – de media pulgada (Kontes K-662750 o equivalente).

NOTA:El siguiente material de vidrio se recomienda para fines de recuperación del solvente durante los procedimientos de concentración que usen concentradores- evaporadores Kuderna-Danish.

- Perlas de vidrio – lavado con solvente, aproximadamente malla 10/40 (carburo de silicio o su equivalente).
- Frasco de erlenmeyer – 250 mL.
- Pipeta volumétrica de 1mL y 10mL.
- Fiolas de 2mL y 5mL.
- Jeringas de 50uL, 100uL y 250uL.
- Botella color ámbar de 1L y 500mL.
- Espátula metálica.

III.2.2 Reactivos

- Sulfato de sodio (granular, anhidro), Na_2SO_4 . Purifique calentando a 400°C por 4 horas, en una recipiente poco profundo, o lavar el sulfato de sodio con cloruro de metileno. Si el sulfato de sodio se prelimpia con cloruro de metileno, un blanco de método se debe analizar, demostrando que no hay interferencia del sulfato de sodio.
- Cloruro de metileno (CH_2Cl_2) – J.T.Backer Analyzed HPLC Solvent.
- Hexane (C_6H_{14}) - J.T.Backer Analyzed HPLC Solvent.
- Acetona grado pesticida (CH_3COCH_3).
- Sílica gel – tamaño de poro 30Å° , malla 100-200 –Sigma Aldrich.
- Fluorisil – malla 60-100 – Fisher Chemical.
- Acido sulfúrico.
- Hidróxido de sodio.
- Agua libre de orgánicos.

III.2.2.A Estándares y diluciones.

- ⚡ Diesel Fuel No. 2 ($50000\ \mu\text{g}/\text{mL}$) – NSY Solutions (anexo 2).
- ⚡ Estándar de Alcanos -Ventana de Integración: ASTM D2887-01 Calibración Mix – RESTEK (anexo 1).

III.2.2.A.1 Estándares de Calibración de petróleo Diesel.

Las siguientes disoluciones se preparan para la calibración del equipo, para la cual se usaran jeringas de $50\ \mu\text{L}$, $100\ \mu\text{L}$ y $2250\ \mu\text{L}$.

Se realizaron 7 preparaciones para la calibración: 50ppm , 100ppm , 250ppm , 500ppm , 1000ppm , 2000ppm y 3000ppm aforadas en una fiola de 2mL con diclorometano, apartir del estándar diesel de 50000ppm (anexo 2). Según indica la tabla III.2.1

Tabla III.2.1 Preparación de la curva de calibración

Estándar de trabajo	Concentración final (mg/L)	Apartir de (mg/L)	Alicuota tomada (uL)	Volumen final (mL)
STD 1	50	2000	50	2
STD 2	100	2000	100	2
STD 3	250	2000	250	2
STD 4	500	50000	20	2
STD 5	1000	50000	40	2
STD 6	2000	50000	80	2
STD 7	3000	50000	120	2

III.2.3.A.2 Estándar de Alcanos – Ventana de Integración D2887.

Un estándar conteniendo series homologas de n-alcanos para establecer los tiempos de retención o ventana de integración (anexo 1).

Solución STOCK de ventana de integración, 20 000 mg/L Utilizada para definir el rango en que se va a efectuar la integración del rango orgánico. Esta se prepara pesando 200mg de estándar que contenga los alcanos normales de al menos C10, C18, C28, C40 (por ejemplo, mix RESTEK D2887) en fiola de 10 mL previamente tarada, disolver y aforar con disulfuro de carbono, guardar en vial con tapa teflón o algún material que asegure la hermeticidad y conservar en refrigeración.

Para la preparación del STD de trabajo (ventana de integración) de 500mg/L, tomar una alícuota de 125µL de la solución STOCK de 20 000mg/L y trasvasar a una fiola de 5mL que tenga disulfuro de carbono: diclorometano (1:1) (los alcanos más pesados tienden a ser mas solubles en bisulfuro de carbono que en otros solventes), mezclar y guardar en vial con tapa teflón u otro que asegure la hermeticidad del vial. Conservar en refrigeración.

III.2.3. EQUIPOS

- Cromatógrafo de gases Agilent Modelo 7890N contiene:
 - ✓ Inyector de columnas capilares con control electrónico de presión Split/Splitless.
 - ✓ Sistema de Detección de llama (FID).
 - ✓ Software CHEMSOLUTIONS versión 4.1.1.

- Cromatógrafo de gases Varian Modelo 450C contiene:
 - ✓ Inyector de columnas capilares con control electrónico de presión Split/Splitless.
 - ✓ Sistema de Detección de llama (FID), captura de electrones (ECD).
 - ✓ Software Galaxia.

- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas Shimadzu QP-2010 contiene:
 - ✓ Inyector de columnas capilares con control electrónico de presión Split/Splitless.
 - ✓ Espectrómetro de Masas (MS).
 - ✓ Software GMS Solutions.

- Aparato Kuderna-Danish (K-D).
 - ✓ Tubo del concentrador - 10-mL, graduado (Kontes K-570050-1025 o equivalente). Un tapón de vidrio esmerilado se usa para prevenir la evaporación de los extractos.
 - ✓ Frasco de evaporación - 500-mL (Kontes K-570001-500 o equivalente). Fijado al tubo del concentrador con resortes, las abrazaderas, o equivalente.
 - ✓ Columna de Snyder - macro de tres bolas (Kontes K-503000-0121 o equivalente).

- Balanza Analítica de apreciación 0,1mg.
- Columna de secado - columna cromatográfica de Pyrex® de 10 mm ID con lana de vidrio Pyrex, en la base y con llave de paso de PTFE.

NOTA: Los discos de vidrio sinterizados son difíciles de descontaminar después que extractos altamente contaminados hayan pasado a través de la columna. Por ello, columnas sin fritado también pueden usarse. Utilice un pequeño tapón de lana de vidrio Pyrex® para mantener el adsorbente. Láve previamente el tapón de lana de vidrio con 50 ml de acetona seguido por 50 ml de solvente de elusión antes de empacar la columna con el adsorbente.

- Manta de calentamiento con reóstato controlado.
- Baño María = calentado, con cubierta de anillo concéntrico, capaz del controlar temperaturas ($\pm 5^\circ \text{C}$). El baño debe estar en una campana extractora.
- Mufla.

III.3 PROCEDIMIENTO

Para la implementación del método, en la determinación de los hidrocarburos totales de petróleo C10-C40 (TPH) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's), se utilizaron los métodos EPA 8015C, EPA 8270, EPA 3510C y EPA 3540C [6, 31, 32, 36].

El procedimiento para el análisis de TPH Y PAH's es el mismo, la única diferencia entre ellos es el análisis cuantitativo, dado que los TPH se analizan por cromatografía de gases (GC) y los PAH's por cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).

En la figura III.3 se muestra las etapas de procedimiento para el análisis de los hidrocarburos (TPH y PAH's) tanto para muestras de agua y suelo (Ver diagrama III.3).

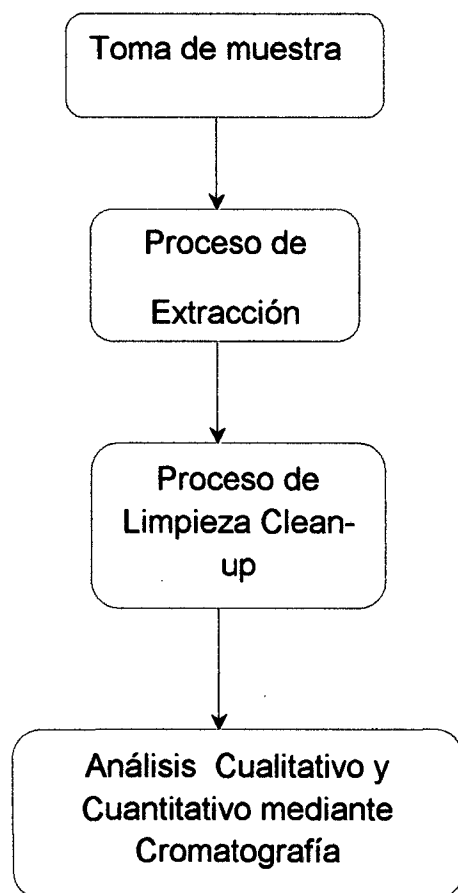


Figura III.3.1: Diagrama del proceso de análisis de Hidrocarburos totales de Petróleo [6].

III.3.1 Toma de muestras [6]

Para realizar la recolección de las muestras se utilizaron botellas de vidrio de 1 litro (para muestras de aguas) y 500mL (para muestras de suelos) color ámbar.

Para las muestras de aguas se toma directamente de la parte superior de la columna de agua y en contra de la corriente; y para las muestras de suelos se toma 20cm de bajo de la superficie del suelo. Posteriormente son almacenadas en un refrigerador para evitar la descomposición y contaminación de las muestras. Para la toma de muestra en diferentes sectores: mineros y petroleros, elegir como puntos de muestreo aquellos que se encuentran más expuestos a posibles focos de contaminación por la presencia de Hidrocarburos totales de petróleo. La obtención de las muestras de suelo y agua se realizó en estaciones distintas (ver Tabla III.3.1).

Tabla III.3.1 Identificación de las muestras a analizar.

Identificación de la muestra	Tipo de matriz	Procedencia de la muestra	
		Empresa	Lugar
M1: a 50m de la zona de perforación	Suelo	E&E Perú S.A	Lote 126 colpa2x - Ucayali
M2: ubicado a 2m del tanque de almacenamiento del campamento	Suelo	SS Traders Markers SAC	Campamento conalvias - Matucana
M3: a un 1m de los tanques de almacenamiento de petróleo.	Suelo	Petroperú	Bagua - Amazonas
M4: a 1m de perforaciones de las pozas	Suelo	Corporación petrolera Talismán SAC	Campamento Situche 4x - Iquitos
M5: altura de la tubería y el canal	Suelo	TGP	Distrito de Vinchos - Huamanga -Ayacucho
M6: a 20m de los generadores eléctricos	Suelo	PMA Generadores Eléctricos-Savia Perú	Peña negra - Talara
M7: a 10m del campamento copahuari	Suelo	Pluspetrol	Comunidad los jardines-Copahuari Sur - Loreto
M8: 8m de la estación de tráileres de carga	Suelo	Minera Gold Field La Cima SAC	Hualgayoc - Cajamarca
M1A: Pozo de bombeo a 10m del campamento pionero	Agua	Xstrata Corporation	Las bambas - Cuzco
M2: efluente de la zona de perforación	Agua	Petroperú	Andoas - Loreto
M3: efluente industrial a 5m de la zona de mantenimiento.	Agua	Petrominerales del Perú S.A	Sheshea 1X - Ucayali
M4: canal ubicado entre el rio lircay y la zona de construcción	Agua	Construcción y Administración S.A	Huancavelica - Ayacucho
M5: salida de las pozas sedimentadoras	Agua	Petroperú	Conchan-Lurín

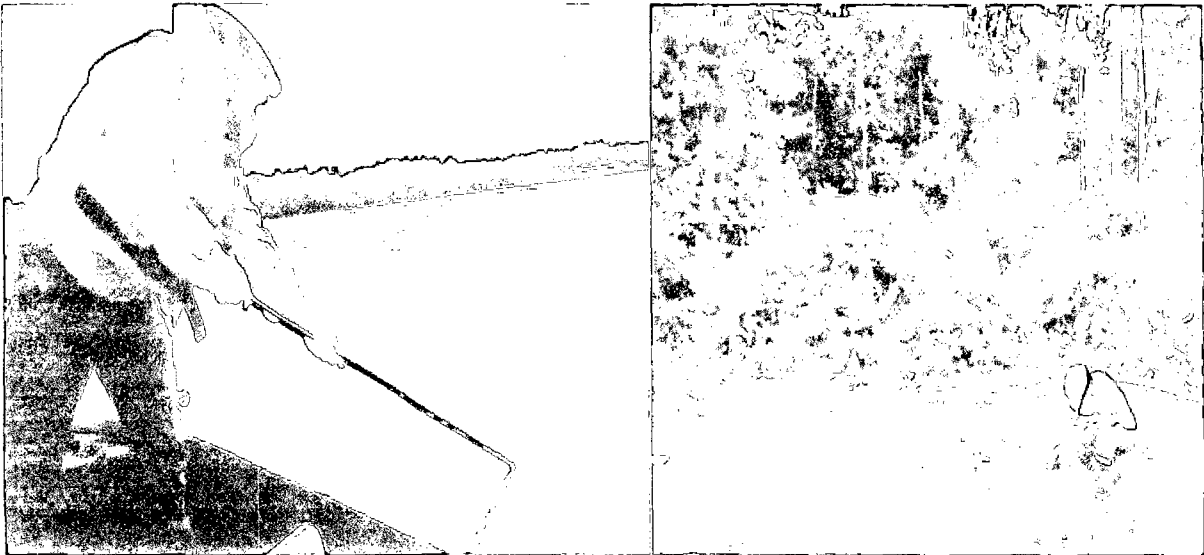


Figura III.3.2 Toma de muestras de agua y suelo.

III.3.2 Proceso de extracción

Para la extracción de hidrocarburos totales de petróleo en matriz acuosa utilizar la extracción líquido-líquido y para la extracción de hidrocarburos totales de petróleo en suelo utilizar la extracción sólido-líquido.

III.3.2.1 Método de extracción líquido-líquido [31]

Para el proceso de extracción para las muestras de agua, se utilizó el método 3510C (ver figura III.3.3).

- Adicionar 1mL de la muestra de agua en la pera de decantación.
- Luego adicionar 30mL de diclorometano para realizar la extracción.
- Tapar y agitar vigorosamente la pera de decantación por 2 minutos, con desfuegos periódicos para liberar la presión de vapores.
- Luego dejar decantar por 10 minutos, hasta observar una clara separación de las fases.

- Recoger la fase inferior (que corresponde a la parte orgánica) en un matraz de 250mL.
- Repetir el proceso de extracción dos veces más, usando porciones frescas del solvente. Combinar los tres extractos solventes.
- Luego filtrar el extracto obtenido, a través de un embudo analítico con papel filtro y sulfato de sodio anhidro, para retener la posible cantidad de agua e impurezas que pudieran ir junto a la parte orgánica.
- Efectuar la concentración del extracto utilizando la técnica Kuderna-Danish (K-D). Conecte el concentrador de 10mL al frasco evaporador de 500mL.
- Trasvasar el extracto secado al concentrador de K-D.
- Agregue uno o dos perlas de ebullición limpias a la Kuderna y conecte la columna Snyder de tres bolas.
- Colocar el aparato de K-D en un baño maría a 65°C, hasta reducir el volumen del extracto a 5 mL, luego dejar enfriar.
- Luego realizar el intercambio de solvente para el proceso de limpieza clean-up, para cual añadir 5mL de hexano a la K-D (el cual contiene 5mL del extracto concentrado) y colocarlo al baño maría a 70°C hasta reducir el volumen a 5mL.
- Trasvasar el extracto concentrado a un vial de 7 mL.

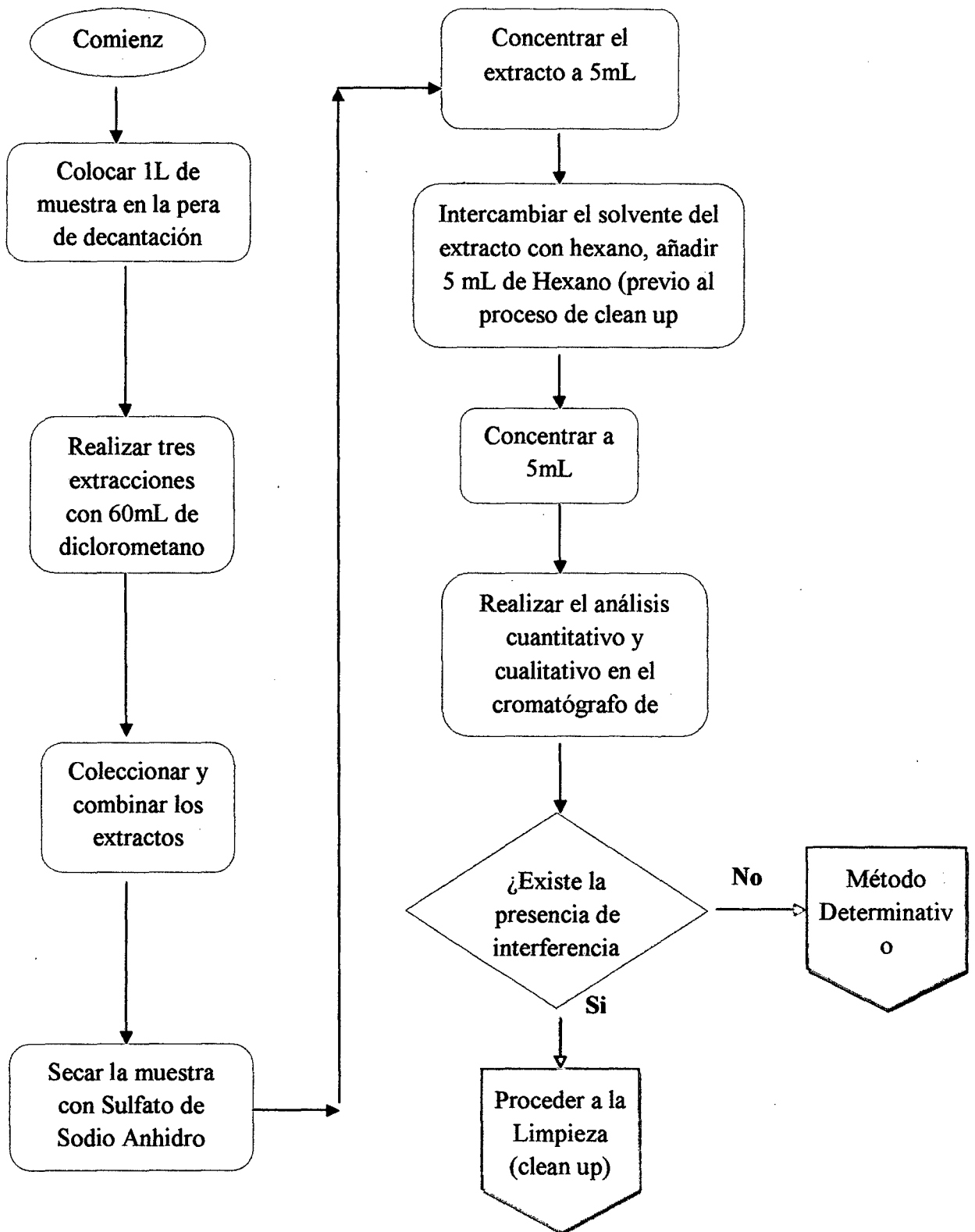


Figura III.3.3 Diagrama del proceso de extracción, para el análisis de muestras de agua según el método 3510 C, extracción líquido-líquido [31].

III.3.2.2 Método de extracción sólido-líquido [32]

Para el proceso de extracción para las muestras de suelo, se utilizó el método 3540C "Soxhlet Extracción" (ver figura III.3.4).

- Pesar 10g de la muestra de suelo, previamente homogenizado.
- Añadir 10g de sulfato de sodio anhidro y mezclar, para retener la posible cantidad de agua y obtener una muestra seca.
- Colocar la muestra en un cartucho de extracción e introducirla en un aparato soxhlet para la extracción.
- Tomar aproximadamente 180 mL del solvente de extracción (diclorometano) en un frasco conteniendo 1 o 2 perlas de ebullición. Sujetar el frasco con el extractor y extraer la muestra por 16 horas a 4-6 ciclos por hora, aproximadamente a 65°C.
- Dejar enfriar el extracto después de completada la extracción.
- Luego filtrar el extracto obtenido, a través de un embudo analítico con papel filtro y sulfato de sodio anhidro, para retener la posible cantidad de agua e impurezas que pudieran ir junto a la parte orgánica.
- Efectuar la concentración del extracto utilizando la técnica Kuderna-Danish (K-D). Conecte el concentrador de 10mL al frasco evaporador de 500mL.
- Trasvasar el extracto secado al concentrador de K-D.
- Agregue uno o dos perlas de ebullición limpias a la Kuderna y conecte la columna Snyder de tres bolas.
- Colocar el aparato de K-D en un baño maría a 65°C, hasta reducir el volumen del extracto a 5 mL, luego dejar enfriar.
- Luego realizar el intercambio de solvente para el proceso de limpieza clean-up, para cual añadir 5mL de hexano a la K-D (el cual contiene 5mL del extracto concentrado) y colocarlo al baño maría a 70°C hasta reducir el volumen a 5mL.
- Trasvasar el extracto concentrado a un vial de 7 mL.

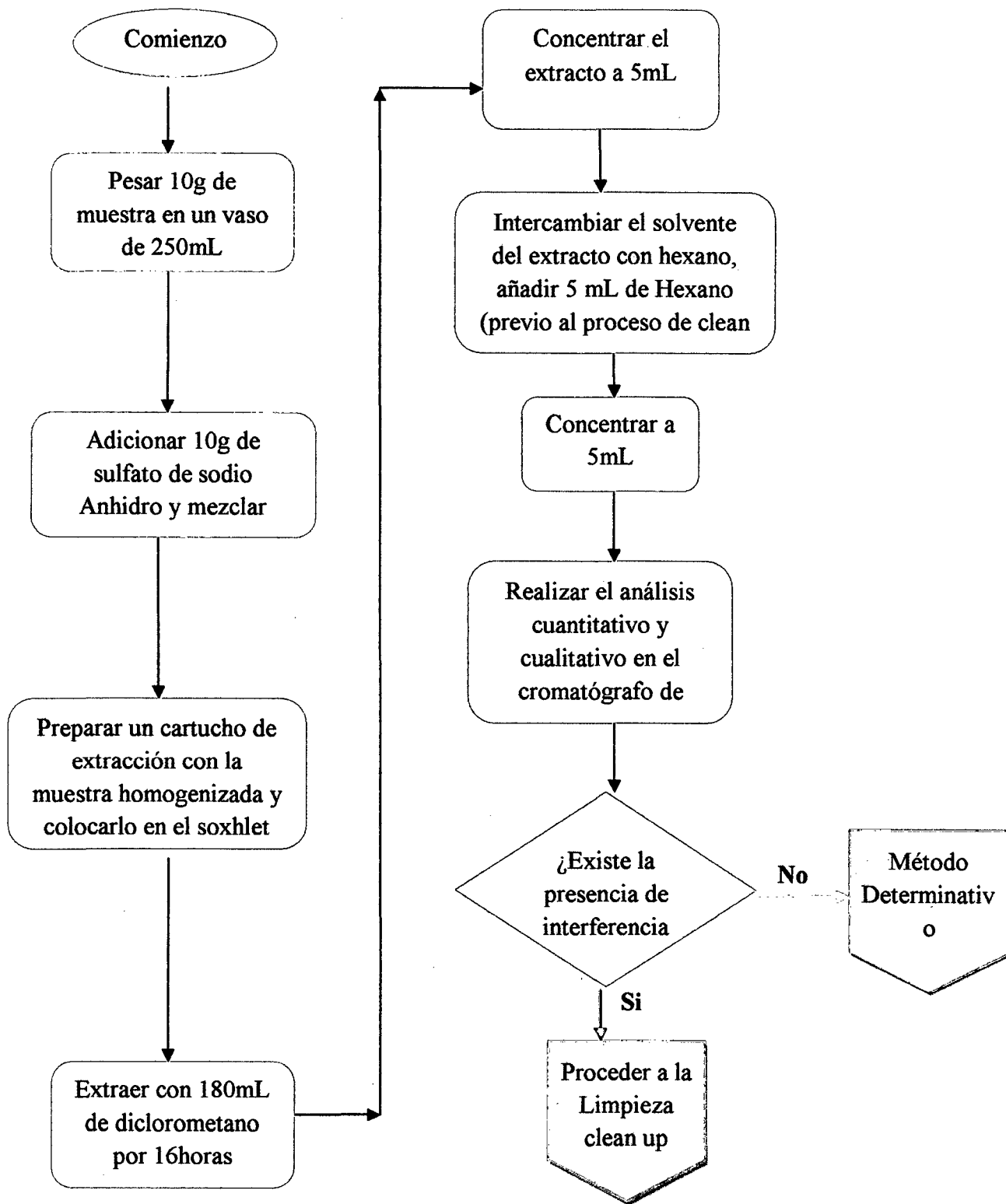


Figura III.5.4 Diagrama del proceso de extracción, para el análisis de muestras de suelo según el método 3510 C, extracción liquido-liquido [32].

III.3.3 Proceso de Limpieza Clean-Up

Debido a la gran afinidad que los compuestos orgánicos tienen hacia los solventes es de esperar que una amplia gama de compuestos sean coextraídos con los analitos (compuestos de interés) cuando se usen solventes para la extracción, en todas las matrices, especialmente aguas muy contaminadas y suelos (o sólidos), originando interferencias en los cromatogramas, entorpeciendo en la interpretación del mismo, la cuantificación de los analitos y deteriorando el rendimiento del sistema cromatográfico. Por ello en determinados casos se hace necesario limpiar los extractos, de modo que se eliminen la mayor parte de las interferencias.

III.3.3.A Descripción general del Proceso.

La limpieza consisten en hacer pasar un volumen determinado (alícuota) el extracto de la muestra, el cual debe ser cambiado de solvente a uno compatible y específico de la técnica de limpieza, a través de un material que puede retener (o dejar pasar) solo un grupo de compuestos, bajo ciertas condiciones de flujo y tipo de solvente, así como la afinidad del los compuestos por el material.

Para el proceso de Limpieza de hidrocarburos totales de petróleo tanto en una matriz acuosa y una matriz de suelo, el extracto de la muestra tiene que estar en hexano y además se usaron dos tipos de procedimientos con el propósito de obtener una mejor eliminación de interferencia presente en la matriz, los dos tipos de procedimientos son:

- ❖ **Procedimiento 1:** Basado en el artículo “Extractable Petroleum Hydrocarbons Fractions (EPH). Washington State Department of Ecology [34].
- ❖ **Procedimiento 2:** Basado en el artículo de Barry Muijs, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) y el Método ISO 9377 – 2, Determinación del índice de Hidrocarburos [33, 35].

A continuación describiremos en qué consiste cada procedimiento:

A) Procedimiento 1[34]:

- Cambiar la polaridad del solvente del extracto (diclorometano), que se obtiene del proceso de extracción, con hexano (no polar).
- Pesar 10g de sílica gel activada en un vaso de 50mL.
- Añadir diclorometano al vaso de 50mL hasta obtener una papilla.
- Trasvasar la papilla a una columna de vidrio de 10mm de ID con llave teflón.
- Añadir 40mL de pentano a la columna y agregar 2cm de sulfato de sodio, luego abrir la llave hasta que haya una capa delgada de pentano sobre el sulfato de sodio.
- Transferir 1 ó 2 mL del extracto en hexano, con una pipeta graduada de 5mL, a la columna y enjuagar con 1mL la pipeta y trasvasar a la columna.
- Colocar una Kuderna Danish, debajo de la columna, para coleccionar el eluato.
- Abrir la llave y permitir que eluya el solvente hasta que haya una capa delgada de solvente sobre el sulfato.
- Añadir 25mL de pentano a la columna, abrir la llave y dejar eluir el solvente hasta que haya una capa delgada de solvente sobre el sulfato. Esta fracción es rica en hidrocarburos alifáticos.
- Luego, añadir 50mL de una mezcla de diclorometano y pentano 40:60 (volumen /volumen) a la columna, abrir la llave y dejar eluir todo el solvente. Esta fracción es rica en aromáticos.
- Si se quiere diferenciar entre alifáticos y aromáticos coleccionar la elución del solvente en kudernas diferentes.
- Finalmente concentrar las muestras en un baño maría a 65°C hasta obtener 1 ó 2mL y si fuera necesario soplar con nitrógeno hasta el volumen requerido.

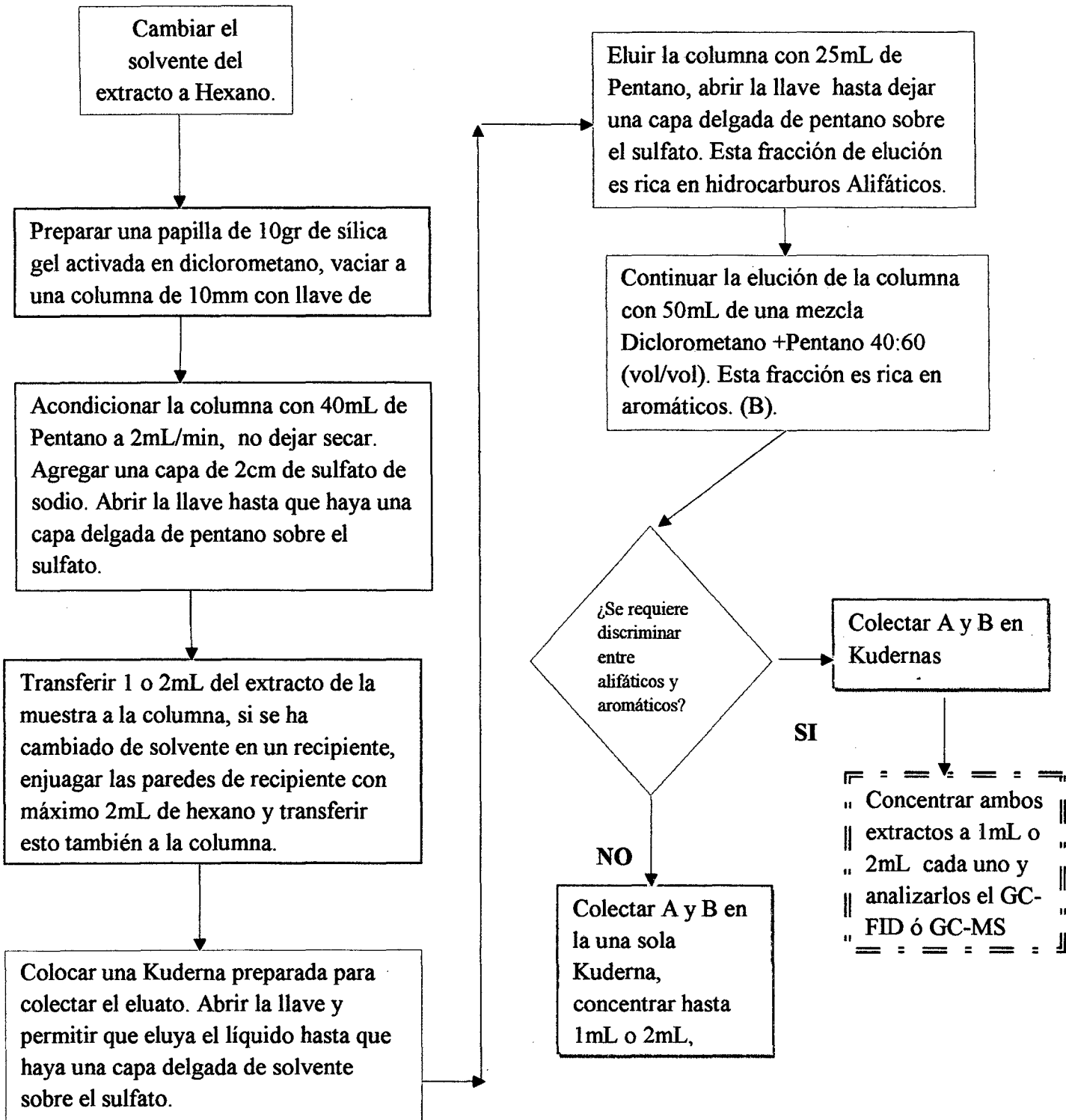


Figura III.3.5 Diagrama del procedimiento 1, para el proceso de limpieza según "Extractable Petroleum Hydrocarbons Fractions (EPH) [34].

A) Procedimiento 2 [33, 35]:

- Cambiar la polaridad del solvente del extracto (diclorometano), que se obtiene del proceso de extracción, con hexano (no polar).
- Pesar 2.2g de sílica gel impregnada al 7% con H_2SO_4 (7g de ácido por cada 93g de sílica), 0.1g de sílica activada, 1g de sílica impregnada al 33% con NaOH 1N (33mL de NaOH 1N por cada 67 g de sílica) y 3g de fluorisil impregnada al 5% con agua (5mL de agua por cada 95g de fluorisil), cada una en un vasos de 50mL.
- Empacar la columna de vidrio de 10mm de ID, de la siguiente manera y en ese orden (de abajo hacia arriba):
 1. Lana de vidrio.
 2. 2.2g de sílica impregnada al 7% con H_2SO_4 .
 3. 0.1g de sílica activada.
 4. 1g de sílica impregnada al 33% con NaOH 1N.
 5. 3g de fluorisil impregnada al 5% con agua.
- Añadir 40mL de hexano a la columna y agregar 2cm de sulfato de sodio, luego abrir la llave hasta que haya una capa delgada de hexano sobre el sulfato de sodio.
- Transferir 1 ó 2 mL del extracto en hexano, con una pipeta graduada de 5mL, a la columna y enjuagar con 1mL la pipeta y trasvasar a la columna.
- Colocar una Kuderna Danish, debajo de la columna, para coleccionar el eluato.
- Abrir la llave y permitir que eluya el solvente hasta que haya una capa delgada de solvente sobre el sulfato.
- Añadir 40mL de hexano a la columna, abrir la llave y dejar eluir todo el solvente.
- Finalmente concentrar las muestras en un baño maría a 65°C hasta obtener 1 ó 2mL y si fuera necesario soplar con nitrógeno hasta el volumen requerido.

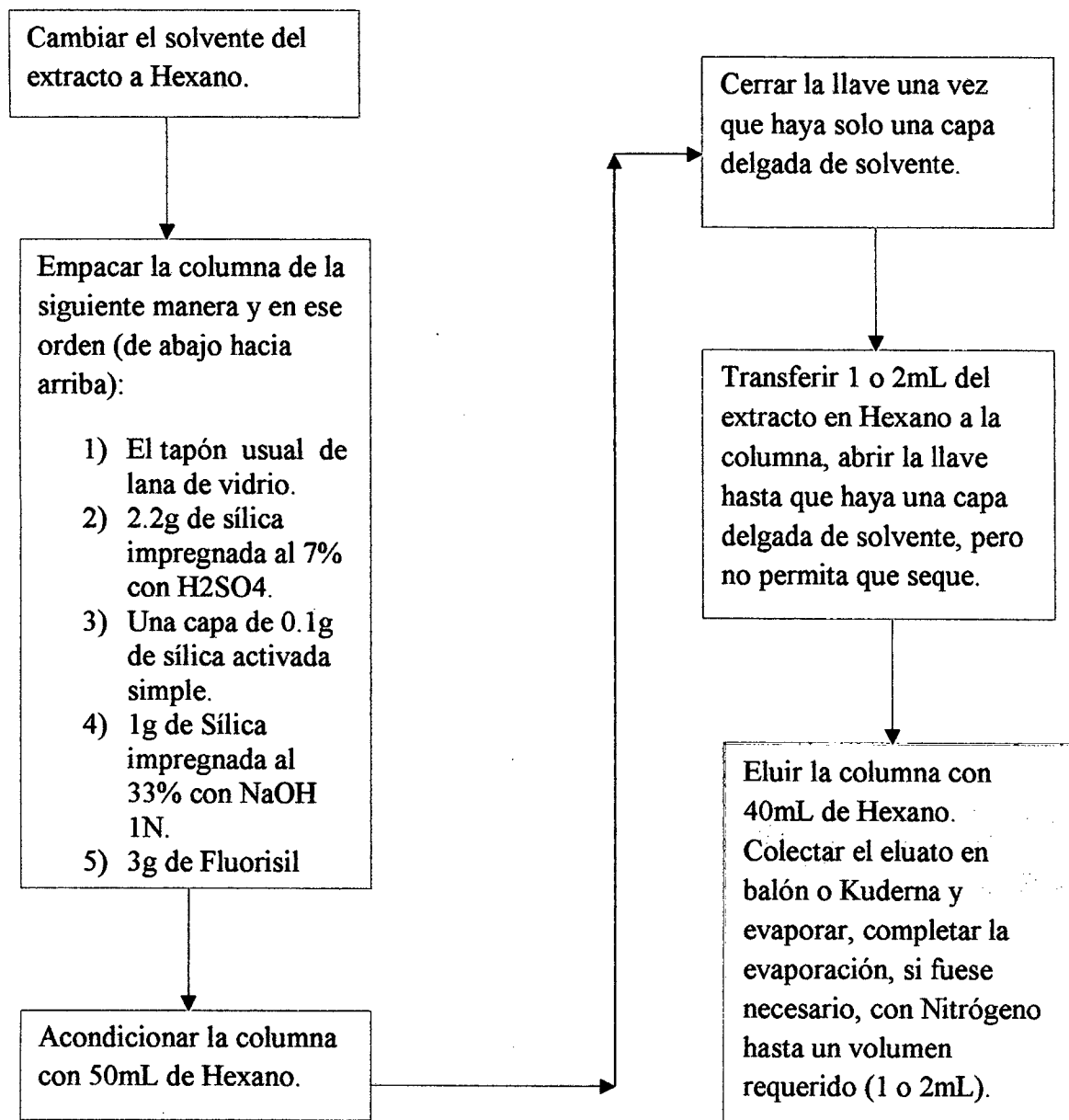


Figura III.3.6 Diagrama del procedimiento 2, para el proceso de limpieza según el Journal of Chromatography A, 1216 (2009) [33] y el Método ISO 9377 – 2 [35].

III.3.4. Proceso de análisis cualitativo y cuantitativo

III.3.4.1 El Cromatograma

Es la representación gráfica de la señal en función del tiempo una vez que la muestra es inyectada a un sistema cromatográfico. Para obtener este cromatograma a la salida de la columna se coloca un sistema de detección y registro, que permite responder a una propiedad de la solución que contiene el analito o del propio analito en función del tiempo [8], ver figura III.3.7.

El cromatograma es útil tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra; las áreas bajo los picos proporcionan una medida cuantitativa de la cantidad de cada componente.

En la figura III.3.7, se presenta como ejemplo un cromatograma que corresponde a la inyección de 2 μ L de una muestra de hidrocarburos totales de petróleo cuya lectura se realizó en las siguientes condiciones presentadas en la tabla III.3.2. Se puede observar la buena resolución de los picos en las condiciones establecidas

Tabla III.3.2. Método de lectura para el análisis de TPH-EPA8015C [6].

Columna	Restek MXT-1 15m X 0.53mm X 0.5 μ m film, T°max 400°C	
Flujo de carrier (He)	constant flow: 10mL/min	
Inyector	Splitless	Temperatura : 290°C
Temperatura del horno	40°C por 2min 12°C/min hasta 325°C sostener por 2min 330°C por 3min	
Detector FID	Temperatura: 360°C	

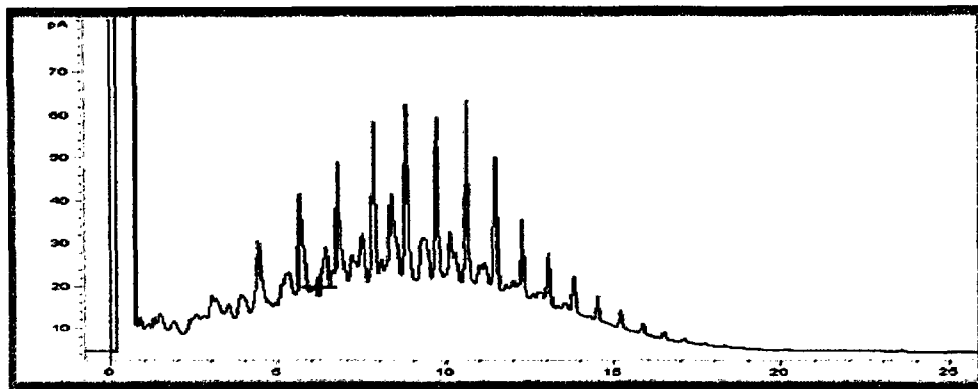


Figura III.3.7. Cromatograma de un estándar de 500ppm de TPH, leída en el cromatógrafo GC-Agilent 7890.

III.3.4.2 Análisis Cualitativo

Un análisis cromatográfico puede dar una amplia información cualitativa si se escoge el sistema de detección adecuado para determinar y establecer la identidad de los componentes de una muestra, de hecho esto se logra fácilmente con cromatógrafos que contienen sistema de detección como el espectrómetro de Masas (MS).

Sin embargo, los cromatógrafos con sistemas de detección sencillos como el detector de ionización a la llama (FID), el detector de conductividad térmica (TCD) o el detector de captura de electrones (ECD); dan como información cualitativa el tiempo de retención del analito, el cual, solo puede ser usado controlando bien las condiciones cromatográficas como: flujo del gas portador, rampa de temperatura de la columna, temperatura del inyector, tipo de fase estacionaria, además de que se debe tener conocimiento de los posibles compuestos de la muestra y una amplia variedad de patrones para realizar comparaciones [19].

El método de las adiciones estándar se puede utilizar para verificar el tiempo de retención del compuesto en cuestión. El tiempo de retención del pico en la muestra no debe cambiar después de efectuada la adición con respecto al valor original si ambos compuestos (el problema y el estándar añadido) son el mismo. Se puede dar el caso que dos compuestos tengan el mismo tiempo de retención en condiciones determinadas, lo que imposibilitaría su identificación. Sin embargo, empleando la columna apropiada con la fase estacionaria conveniente a una temperatura de columna y velocidad de elusión es posible obtener una suficiente resolución de los picos cromatográficos.

III.3.4.3 Análisis Cuantitativo

Para realizar el análisis cuantitativo se debe tener en cuenta las técnicas de muestreo, absorción o descomposición de la muestra en el cromatógrafo, así como el comportamiento del detector y de las técnicas de calibración (externa o interna) para cuantificar cada pico del cromatograma. Para la cuantificación de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) se utilizó la calibración por estándar externo y para la cuantificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos se utilizó la calibración por estándar interno [19].

Dado que los TPH contienen un gran número de compuestos que podrían producir picos bien resueltos en el cromatograma GC/FID, estos contienen además varios compuestos que no son cromatográficamente separables (ver figura III.3.8). Esta mezcla compleja da como resultado la “campana” característica de los cromatogramas de estos combustibles. En suma, aunque los picos resueltos son importantes para la identificación de un tipo específico de combustible, el área de la zona de la mezcla no resuelta contribuye con una parte significativa a la respuesta total [6].

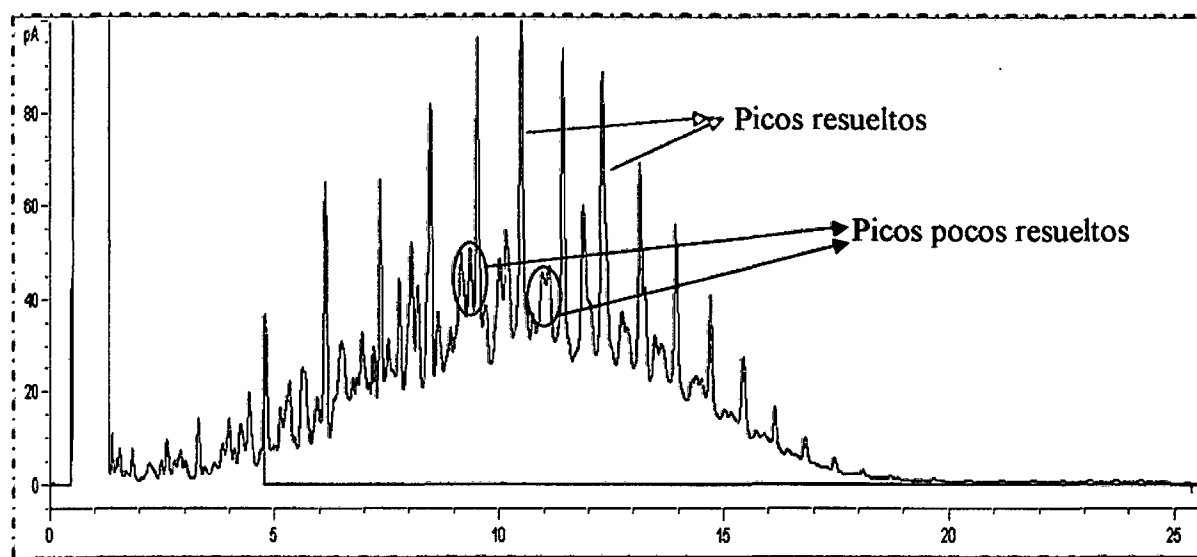


Figura III.3.8: Cromatograma de un STD-500ppm de Diesel (C10-C40).

Para el análisis de TPH, sumar el área de todos los picos eluidos entre el C₁₀ y el C₄₀. Esta área es generada proyectando una línea horizontal entre los tiempos de retención de C₁₀ y C₄₀.

III.3.4.3.A Calibración estándar externa

La calibración estándar externa es una de los enfoques más comunes para las calibraciones. En un estándar externo se preparan muestras patrones de concentración conocida, que se analizan y permiten construir una curva de calibración para cada componente a cuantificar. Con este método es necesario medir exactamente los volúmenes inyectados tanto de los patrones como de la muestra problema. Y además, es la calibración que se uso para la determinación de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (C10 – C40).

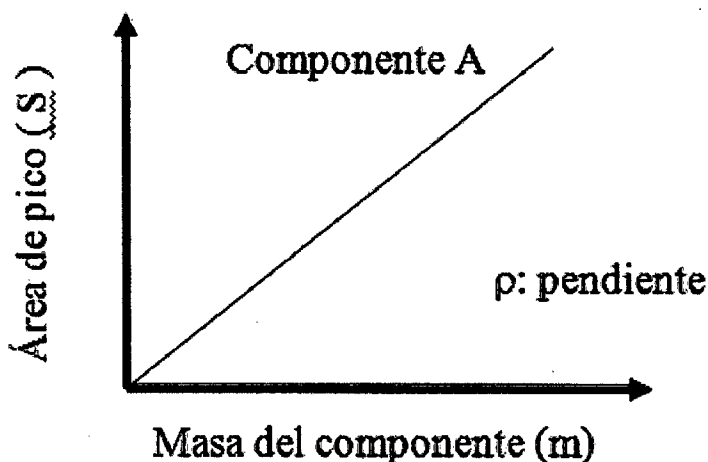


Figura III.3.9. Curva de calibración del estándar externo [37].

La ecuación de esta curva estará expresada como $S = \rho \cdot m$. Donde se inyecta una masa exacta de la muestra o estándar ($m_{A_{std}}$) y se determina el área del componente a analizar,

por ejemplo el componente A, de la curva extrapolando la masa de A por $m_A = \frac{S_A}{\rho_A}$ y

después se aplica la siguiente ecuación:

$$m_{A_{problema}} = \frac{S_{A_{problema}}}{S_{A_{std}}} m_{A_{std}} \quad (\text{Ec. 12})$$

Su principal desventaja es que es grandemente afectada por la estabilidad del sistema del detector cromatográfico y la presencia de interferencias cromatográficas en una muestra o

extracto de muestras, además la necesidad de una buena reproducibilidad en la inyección de la muestra y las condiciones del sistema no deben cambiar de una inyección a la otra. Las inyecciones reproducibles se logran más con un sistema automatizado de inyección [39].

III.3.4.3.B Calibración Estándar Interno

En este caso se agrega a la muestra problema una cantidad conocida de un compuesto que no está presente originalmente. En este caso, la calibración se realiza analizando patrones de concentración conocida para cada componente a cuantificar a los cuales se le agrega la misma cantidad del estándar interno que a la muestra problema. La curva de calibración se construye graficando el cociente entre la señal del analito problema y el estándar interno en función de la concentración del analito problema. Este método elimina el error cometido por la falta de reproducibilidad en el volumen inyectado. Y además, es la calibración que se usa para la determinación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's).

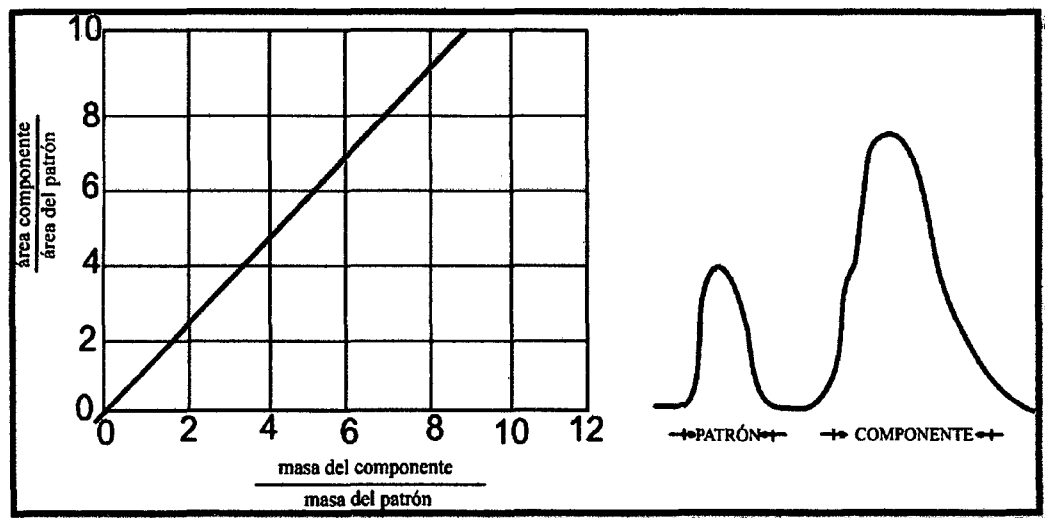


Figura III.3.10. Curva calibración del estándar interno [38].

De la grafica: $X = \frac{M_x}{M_{is}}$ $Y = \frac{A_x}{A_{is}}$

Donde: M_x : masa del analito inyectado.
 M_{is} : masa del estándar interno.
 A_x : área del analito.

Ais: área del estándar interno.

La ecuación de esta curva estará expresada como $A = \rho \cdot m + b$, de lo cual se deduce:

$$M_X = \frac{\left(\frac{Ax}{Ais} - b\right)}{\rho} * Mis \quad (\text{Ec.13})$$

Si la curva pasa por el origen entonces, se aplicara la siguiente ecuación para la determinación de la muestra a analizar:

$$M_{\text{problema}} = \frac{A_{\text{problema}}}{A_{A_{\text{std}}}} M_{A_{\text{std}}} \quad (\text{Ec.14})$$

La ventaja de los estándares internos es que son usados para compensar algunas variaciones comunes en el comportamiento del sistema durante la separación cromatográfica de los compuestos a analizar.

La principal desventaja de la calibración estándar interno es que los estándares internos deben ser compuestos que no son encontrados en las muestras que se analizan y que estas deben producir una respuesta inequívoca en el detector del sistema cromatográfico.

Cualquier estándar interno que se emplee, los analistas necesitan demostrar que la medida del estándar interno no sea afectada por los analitos a analizar, surrogados, o por las interferencias de la matriz. En general, la calibración de los estándar internos no es de utilidad para los métodos de GC y HPLC con detectores que no estén acoplados a un espectrómetro de masas, por la inhabilidad de resolver cromatográficamente muchos estándares internos de los compuestos a analizar. El uso de los detectores MS hace práctica la calibración del estándar interno, porque las masas de los estándares internos pueden ser resueltas de aquellos compuestos a analizar, aun cuando la resolución cromatográfica no pueda ser lograda [39].

III.4 METODOLOGIA

En esta sección se describirán el tipo de columna a utilizar, los métodos de lecturas y configuraciones empleadas para los análisis de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH) y Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's).

III.4.1 Columnas disponibles para el análisis

En este trabajo se han usado las siguientes columnas:

✦ Para el análisis de los Hidrocarburos Totales de petróleo (C10-C40):

- Columna DB-5MS: Es una columna capilar, cuya dimensión es de 30m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm espesor de película (fase estacionaria), cuya fase estacionaria es apolar y está compuesta por 5%-fenilmetilpolisiloxano, su estabilidad es hasta los 325°C [41].
- Columna Restek-MXT-1: Es una columna capilar metálica, cuya dimensión es de 15 m de longitud, 0.53 mm de diámetro interno y 0.5 μm espesor de película (fase estacionaria), cuya fase estacionaria es apolar y está compuesta por 100% dimetilpolisiloxano, su estabilidad es hasta los 430°C [40]. Esta columna fue usada por la empresa Enviromental Laboratories Perú SAC.

✦ Para el análisis de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's) :

- ❖ Columna PTFE-5 : Es una columna capilar, cuya dimensión es de 30m de longitud, 0,25mm de diámetro interno y 0,25 μm espesor de película (fase estacionaria), cuya fase estacionaria es apolar y está compuesta por 5%-fenilmetilpolisiloxano, sirva para el análisis de semivolátiles [42].

III.4.2 Método de Lectura Cromatográfica

III.4.2.1 Análisis de hidrocarburos totales de petróleo (TPH)

Para el análisis de TPH (C10-C40) en muestras de aguas y suelos se desarrollo el siguiente método de lectura instrumental – GC VARIAN 450 (ver tabla III.4.1); el cual está basado en el método EPA 8015C [6], de acuerdo al material y equipo disponible en el laboratorio de Físicoquímica de la Universidad Nacional de Ingeniería.

Tabla III.4.1: Método 1, para análisis de TPH en el cromatógrafo GC Varian 450C.

Inyector	Modo de inyección : splitless / Manual Temperatura : 290°C		
Columna	Flujo: 1.3 mL/min. Modelo: DB-5MS. Dimensiones : 30m*0.25mm*025 µm T°max : 325°C		
Rampa de Temperatura	Rate (mL/min)	Temperatura (°C)	Hold (min)
		40°C	2min
	10mL/min	300°C	4min
Detector	Tipo	FID	
	Temperatura	300°C	
	Flujo de Helio (Make-up)	20mL/min	
	Flujo de Aire	300mL/min	
	Flujo de Hidrogeno	30mL/min	

Para los resultados que se obtendrán en el análisis de TPH para las muestras de agua y suelo con el equipo de cromatógrafo de gases GC Varian-450C, se realizó una verificación de resultados con el cromatógrafo de gases Agilent 7890N pertenecientes a la empresa Enviromental Laboratories SAC. Las condiciones instrumentales para la cuantificación de los TPH's mediante el cromatógrafo de gases Agilent 7890N, se muestran en la siguiente tabla:

Tabla III.4.2: Método 2, para análisis de TPH en el cromatógrafo GC Agilent 7890N.

Inyector	Modo de inyección : splitless /Automático Temperatura : 290°C		
Columna	Flujo : 10 mL/min Modelo : Restek MXT-1 Dimensiones : 15m*0.53mm*0.5µm T°max : 340°C		
Rampa de Temperatura	Rate (mL/min)	Temperatura (°C)	Hold (min)
		40°C	2min
	12mL/min	330°C	5min
Detector	Tipo	FID	
	Temperatura	360°C	
	Flujo de Helio (Make-up)	20mL/min	
	Flujo de Aire	300mL/min	
	Flujo de Hidrogeno	30mL/min	

III.4.2.2 Análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's)

Para el análisis de los hidrocarburos aromáticos policíclicos se tiene el siguiente método de lectura instrumental (ver tabla IV.3); el cual está basado en el método EPA 8270 [36], de acuerdo al material y equipo disponible en el laboratorio.

Tabla III.4.3: Método 3, para el Análisis de PAH's en el equipo GC-MS QP 2010.

Inyector	Modo de inyección : splitless / Automático Temperatura : 290°C		
Columna	Flujo : 1.2 mL/min Modelo : PTE-5 Dimensiones : 30m*0.25mm*0.25µm T°max : 325°C		
Rampa de Temperatura	Rate (mL/min)	Temperatura (°C)	Hold (min)
		35°C	1min
	20mL/min	260°C	0min
	6mL/min	305	5min
Detector	Tipo	Espectrómetro de Masas	
	Temperatura de la interface	290°C	
	Temperatura de la Fuente de iones	200°C	

III.4.3 Configuraciones cromatográficas para la aplicación del método de análisis

Las configuraciones en cromatografía corresponden a los sistemas de detección e inyección para el tipo de análisis de un determinado analito ó analitos.

III.4.3.1 Primera configuración cromatográfica

Esta primera configuración se usará para la determinación de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (C10-C40), en donde la muestra es tomada por medio de una jeringa para gases, que a su vez es ingresada al inyector modo splitless en donde se vaporizará la muestra, y cuando se active el inyector, la muestra vaporizada es arrastrada por el gas carrier (He) hasta llegar a la columna, en donde ocurre la separación para luego ser detectada por el FID.

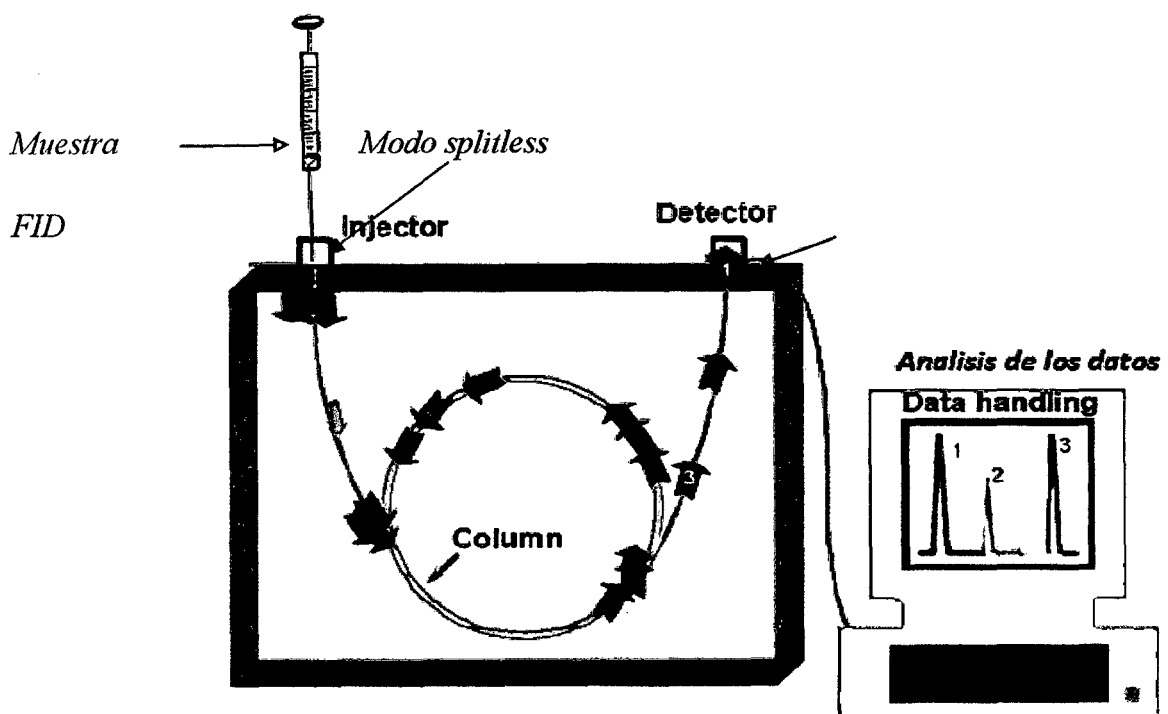


Figura III.4.1 Primera configuración cromatográfica para el análisis de TPH [43].

El modo de inyección para las muestras de agua y suelo es del tipo splitless, debido a que en ciertas muestras se pueden encontrar concentraciones bajas (trazas) de Hidrocarburos de Petróleo; dado que este modo de inyección consiste en introducir toda la muestra vaporizada a la columna cromatográfica, a comparación del modo Split donde es introducida cierta porción de la muestra a la columna.

Luego los componentes separados en la columna, son detectados por el FID produciendo señales diferentes para cada componente, dando como resultado los cromatogramas.

III.4.3.2 Segunda configuración cromatográfica

Esta segunda configuración se usará para la determinación de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's), en donde la muestra es tomada por medio de una jeringa para gases, que a su vez es ingresada al inyector en modo splitless en donde se vaporiza la muestra, y cuando se active el inyector, la muestra vaporizada será arrastrada por el gas carrier (He) hasta llegar a la columna, en donde ocurrirá la separación (ver figura III.4.2), para luego ser detectada por el Espectrómetro de masas.

La diferencia de la segunda con la primera configuración es el detector, en cuanto a la inyección y separación de la muestra es la misma configuración.

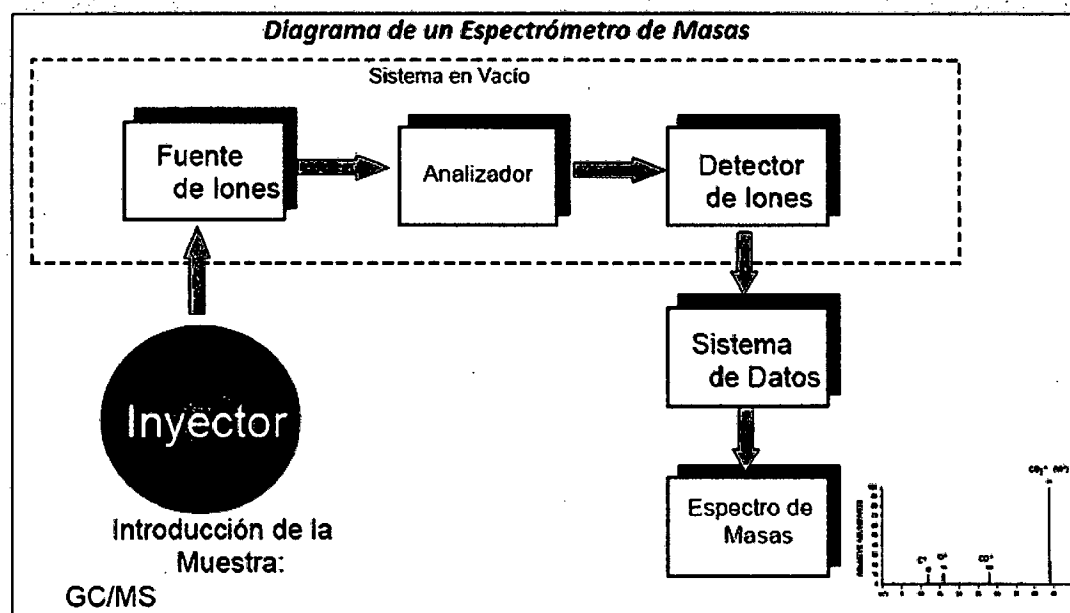
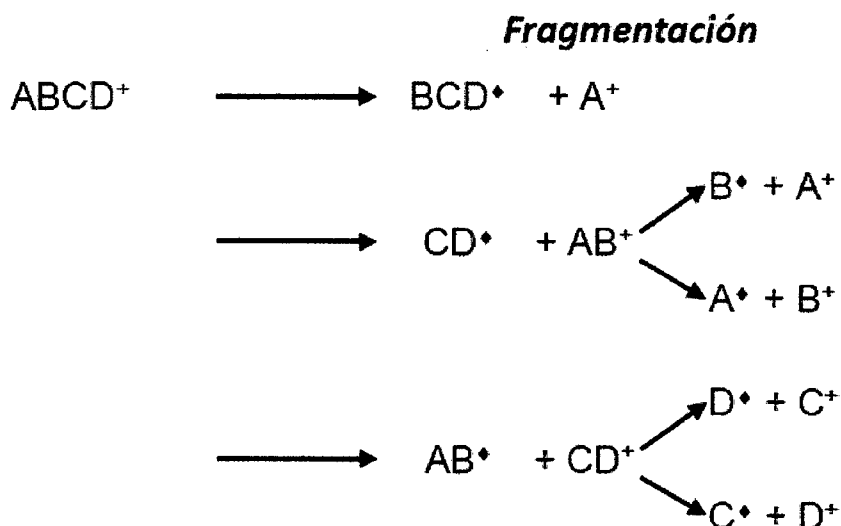


Figura III.4.2. Primera configuración cromatográfica para el análisis de PAH's [25].

Los componentes (moléculas) separadas de las columnas son ionizadas en la fuente de iones, donde electrones acelerados a través de un campo eléctrico adquieren energía cinética considerable y interactúan con las moléculas (ABCD) para originar especies cargadas (iones):



En este caso $ABCD^+$ es catión- radical molecular. Normalmente $ABCD^+$ se forma en un estado excitado y puede sufrir fragmentación, que puede ser de diferentes formas



Los iones producidos son separados de acuerdo a la razón masa/carga (m/z) por medio de un analizador tipo cuadrupolo. Los iones así separados son detectados como corrientes iónicas cuyas intensidades son proporcionales a sus abundancias respectivas. Procesando esta información se obtiene un espectro de masas (EM),

La necesidad del alto vacío en el espectrómetro de masas es para asegurar la ausencia de colisiones del ión con otras moléculas gaseosas desde la fuente de ionización hasta el detector. Esas interacciones a las que pueden ocurrir con las paredes del instrumento provocan que los iones pierdan su carga. Por otro lado, las interacciones ión-molécula pueden producir reacciones no deseadas e incrementar la complejidad de los espectros.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

IV.1. ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (C10-C40).

Para el desarrollo del método de análisis para la determinación de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (C10-C40), para muestras provenientes de industrias petroleras, mineras y otras (ver tabla III.3.1), incluye el tratamiento de la muestra (proceso de extracción y proceso de limpieza) y el método de lectura. (Ver tabla IV.1).

Tabla IV.1 Criterios para el análisis de Hidrocarburos totales de petróleo (C10-C40).

Método de Lectura	Configuración	Tipo de Muestras	Tratamiento de la muestra		Observaciones
			Proceso de extracción	Proceso de Limpieza	
Método 1 (GC-Varian 450C) ó Método 2 (GC-Agilent 7890)	Primera	Aguas	Extracción líquido-líquido	Procedimiento (1 ó 2)	Para el análisis de muestras de aguas y suelos se usaron ambos métodos. El método 2 es para la verificación de los resultados. Para el proceso de limpieza se realizó una comparación entre ambos procedimientos (1 y 2)
		Suelo	Extracción sólido-líquido	Procedimiento (1 ó 2)	

Para la determinación de TPH para las muestras, se describe el método de lectura cromatográfica para el análisis de los hidrocarburos totales de petróleo (C10-C40), para lo cual se considero lo siguiente:

- # Identificación de los hidrocarburos de petróleo (C10-C40).
- # Cuantificación de los hidrocarburos de petróleo (C10-C40).

Tabla IV.2 Método de Lectura para el cromatógrafo GC-Varian 450Cen el análisis de TPH (C10-C40).

Método de Lectura	Configuración	Muestras	Descripción
Método 1	Primera	Aguas y suelos	El desarrollo del método de lectura se realiza con estándares certificados y el cálculo de la curva con calibración estándar externo.

IV.1.1 Identificación de los Hidrocarburos

Para realizar la cuantificación de los hidrocarburos totales de petróleo (C10-C40), presentes en la muestra, primero se tuvo que identificar los tiempos de retención de los diferentes tipos de hidrocarburos presentes desde C10 (n-decano) a C40(n-tetracontano) y establecer luego una ventana de integración para el análisis [6].

Se utilizo un estándar certificado (ver anexo 1- ventana de integracion-D2887) de 500mg/L para definir el rango en que se va a efectuar la integración de los Hidrocarburos totales de petróleo. Ver figura IV.1

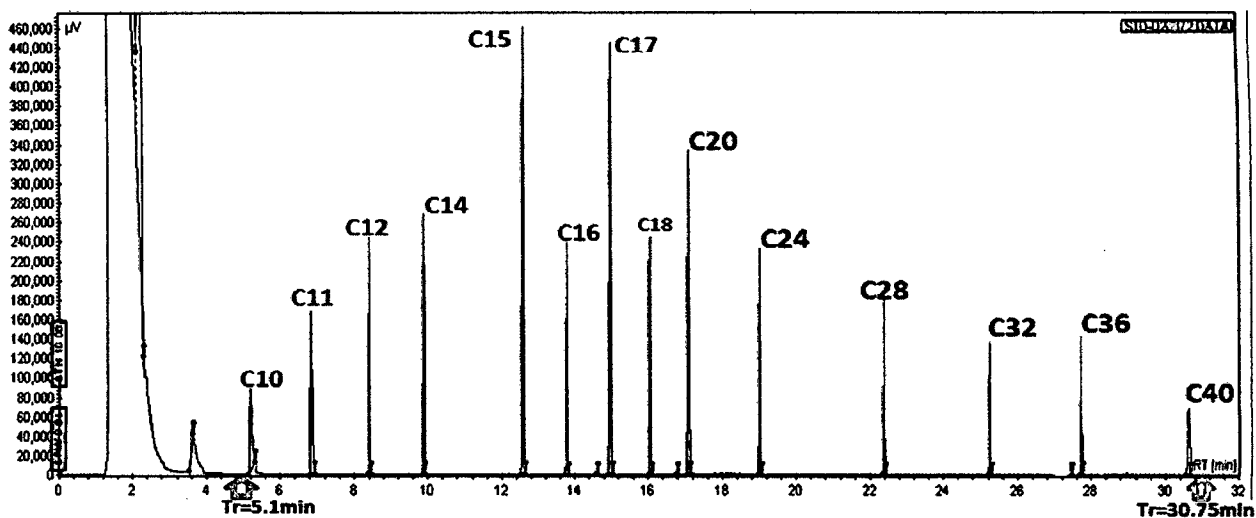


Figura IV.1 Ventana de integración C10-C40 en el cromatógrafo GC-Varian 450C.

En la figura IV.1 se observa los tiempos de retención de los diferentes hidrocarburos.

Tabla IV.3 Tiempo de retención de los hidrocarburos en el cromatógrafo GC-varian 450C

Tipos de Hidrocarburos	Tiempo de retención (min)
C10 (n-decano)	5.13
C11 (n-undecano)	6.85
C12(n-dodecano)	8.42
C14(n-tetradecano)	9.91
C15(n-pentadecano)	12.6
C16(n-hexadecano)	13.8
C17(n- heptadecano)	14.88
C18(n-octadecano)	16.02
C20(n-icosano)	17.1
C24(n-tetracosano)	19.02
C28(n-octacosano)	22.4
C32(n-dotriacontano)	25.26
C36(n-hexatriacontano)	27.75
C40 (n-tetracontano)	30.72

Para establecer el rango de integración, se considero el tiempo de retención en el cual empieza a detectarse el C10 ($t_{Ri}=5.1\text{min}$) y el tiempo en cual termina de detectarse el C40 ($t_{Rf}=30.75\text{min}$).

IV.1.2 Cuantificación de los TPH (C10-C40)

Para la determinación cuantitativa de las muestras, se empleo la calibración por estándar externo, para el cual se realizó una curva de calibración (ver tabla III.2.1) [43], considerando los tiempos de retención de C10 ($t_{Ri}=5.1\text{min}$) y C40 ($t_{Rf}=30.75\text{min}$). Obteniéndose así el cromatograma siguiente:

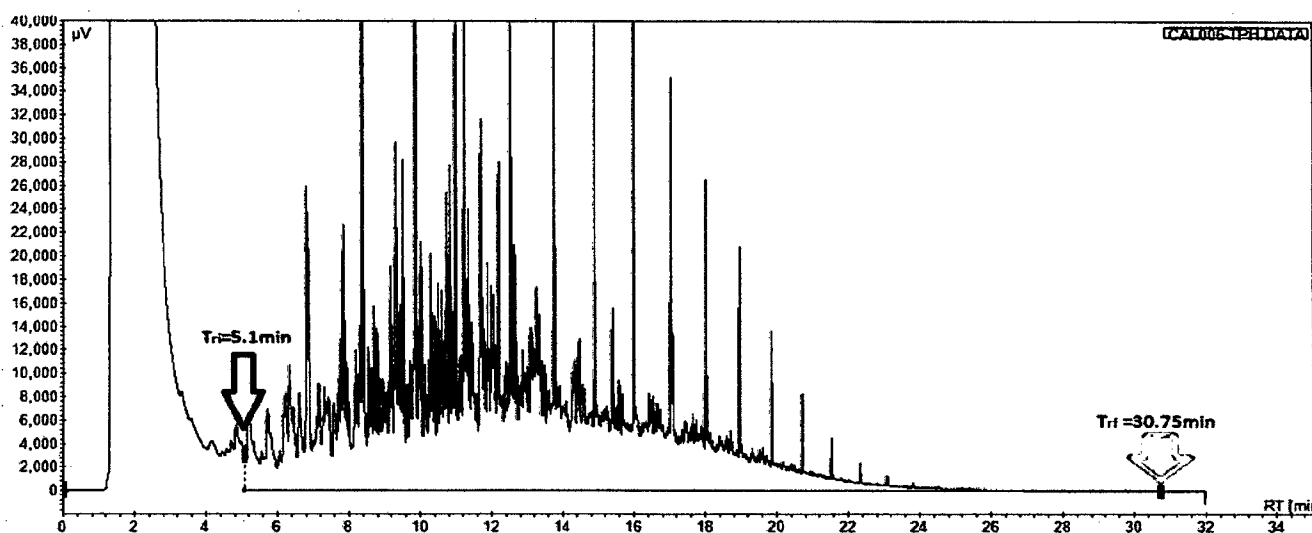


Figura IV.2 Lectura del estándar de 2000ppm de TPH (C10-C40) en el cromatógrafo GC Varian 450C

De las lecturas cromatográficas de los estándares de calibración se obtuvieron los siguientes resultados, (ver tabla IV.4):

Tabla IV.4 Valores de las áreas de los estándares de calibración obtenidas en el cromatógrafo GC Varian 450C.

Concentración del estándar (mg/L)	Área ($\mu\text{v} \cdot \text{min}$)
50	10323.5
100	13261.8
250	21235.4
500	43318.3
1000	77249.1
2000	119194.8
3000	163396.4

Graficando los valores de la tabla IV.4, por regresión lineal se tiene:

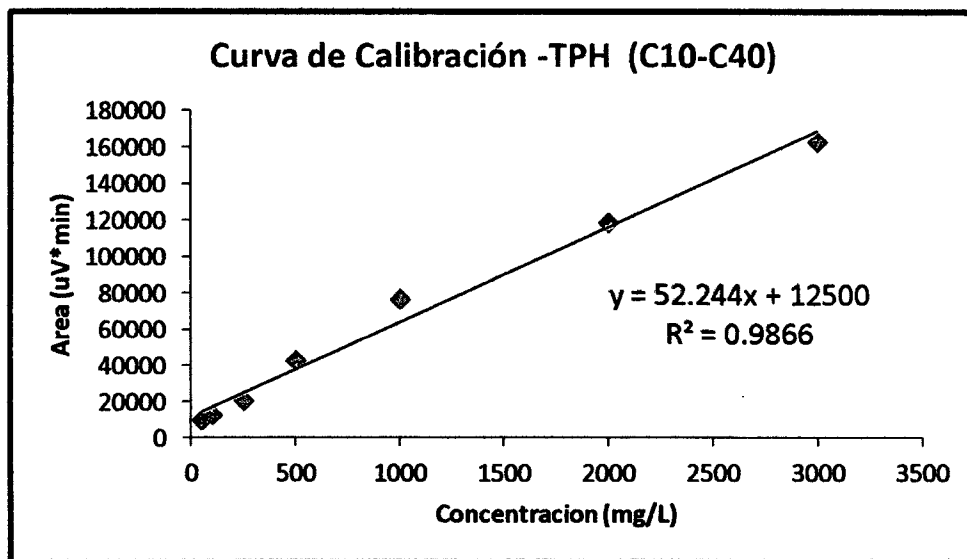


Figura IV.3 Gráfica del Área vs la Concentración de TPH (C10-C40) obtenidas del cromatógrafo GC- Varian 450C.

Del gráfico, la ecuación de la curva de calibración está dado por la siguiente ecuación:

$$y = 52.244x + 12500 \quad (\text{Ec. 15})$$

Donde:

- ✓ Y: Respuesta de los hidrocarburos en la muestra (integración base-Base) en unidad de área.
- ✓ X : Concentración de hidrocarburos totales en el extracto (mg/L)

Reemplazando:

$$\text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) = 52.244 \cdot \text{concentración del extracto (mg/L)} + 12500$$

(Ec. 16)

La concentración de hidrocarburos totales de petróleo (C10-C40) presentes en el extracto, obtenido a partir del proceso de extracción y de limpieza, está dada por la Ec.16, pero la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (C10-C40) presentes en la muestra de agua y suelo está dado por:

$$C_{\text{TPH}} = \frac{\text{Extracto} \cdot V_{\text{extracto}} \text{ (mL)}}{\text{Volumen inicial (mL) ó } W_{\text{inicial}} \text{ (g)}}$$

Ec.17

Donde:

- C_{TPH} : Concentración (cantidad) de Hidrocarburos Totales de Petróleo (C10-C40) presentes en la muestra de agua ó suelo, (mg/L) ó (mg/Kg).
- C_{extracto} : Concentración (cantidad) de TPH presentes en el extracto (mg/L).
- V_{extracto} : Volumen del extracto es 5 mL.
- V_{inicial} : Volumen inicial para las muestras de aguas (mL), ó
 W_{inicial} : Peso inicial de la muestras de suelos (g).

Para las muestras analizadas en este trabajo:

$$V_{\text{inicial}} = 1000\text{mL}$$

$$W_{\text{inicial}} = 10\text{g}$$

IV.1.3 Análisis de las muestras de agua y suelo

Para la determinación de los hidrocarburos totales de petróleo (C10-C40) para muestras de agua y suelo, provenientes de industrias petroleras y mineras, se considero los siguientes pasos para el análisis (ver figura III.3.1 y tabla IV.1):

- ❖ Toma de muestra: el muestreo de aguas y suelo se realizaron en diferentes puntos (ver tabla III.3.1).
- ❖ Tratamiento de la muestra (proceso de extracción y proceso de limpieza).
- ❖ Análisis cuantitativo de la muestra extraída (lectura cromatográfica).

IV.1.3.1 Tratamiento de la muestra

A. Proceso de extracción

Según la tabla IV.1; para las muestras de aguas, se uso el proceso de extracción liquido – liquido (ver figura III.3.2) y para las muestras de suelo se uso el proceso de extracción solido-liquido (ver figura III.3.3).

Los extractos obtenidos a partir del proceso de extracción se muestran a continuación (ver figura IV.4):

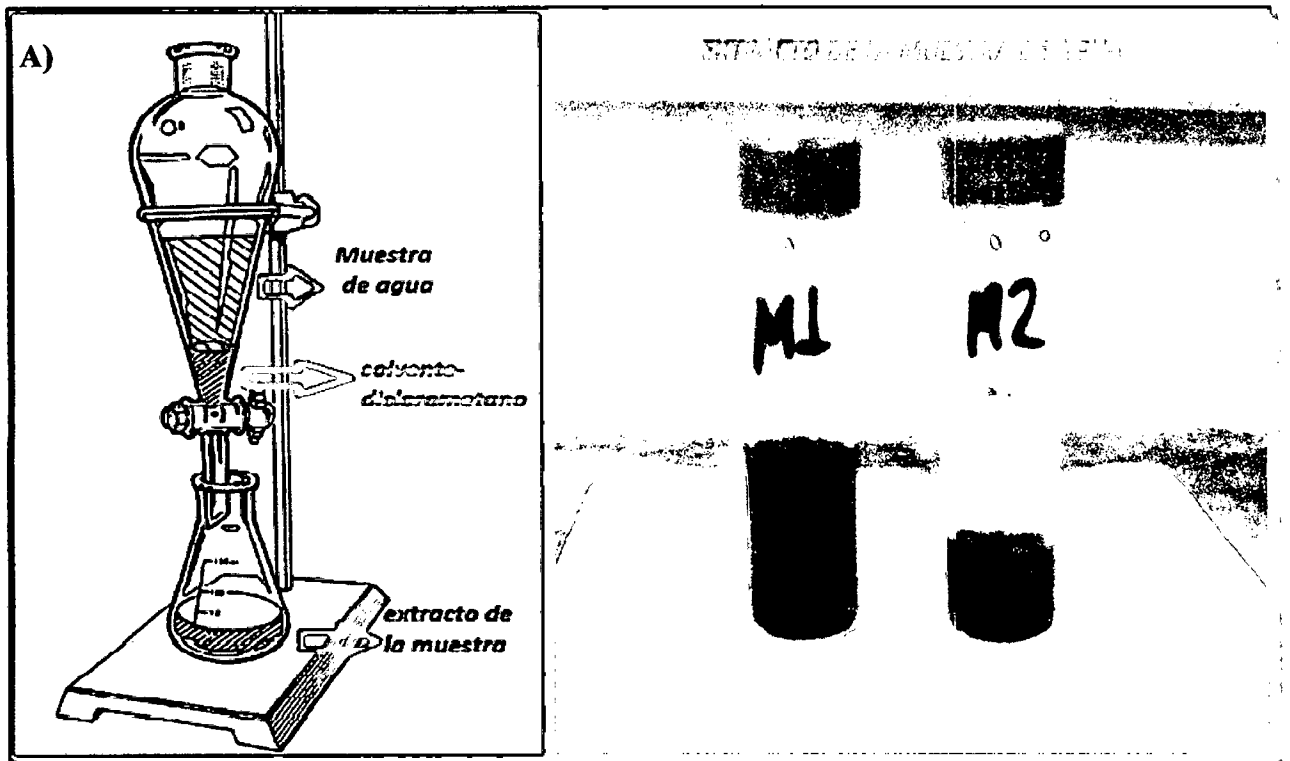


Figura IV.4 Extractos obtenidos para las muestras de agua, A) material para la extracción en aguas, B) extractos obtenidos [31].

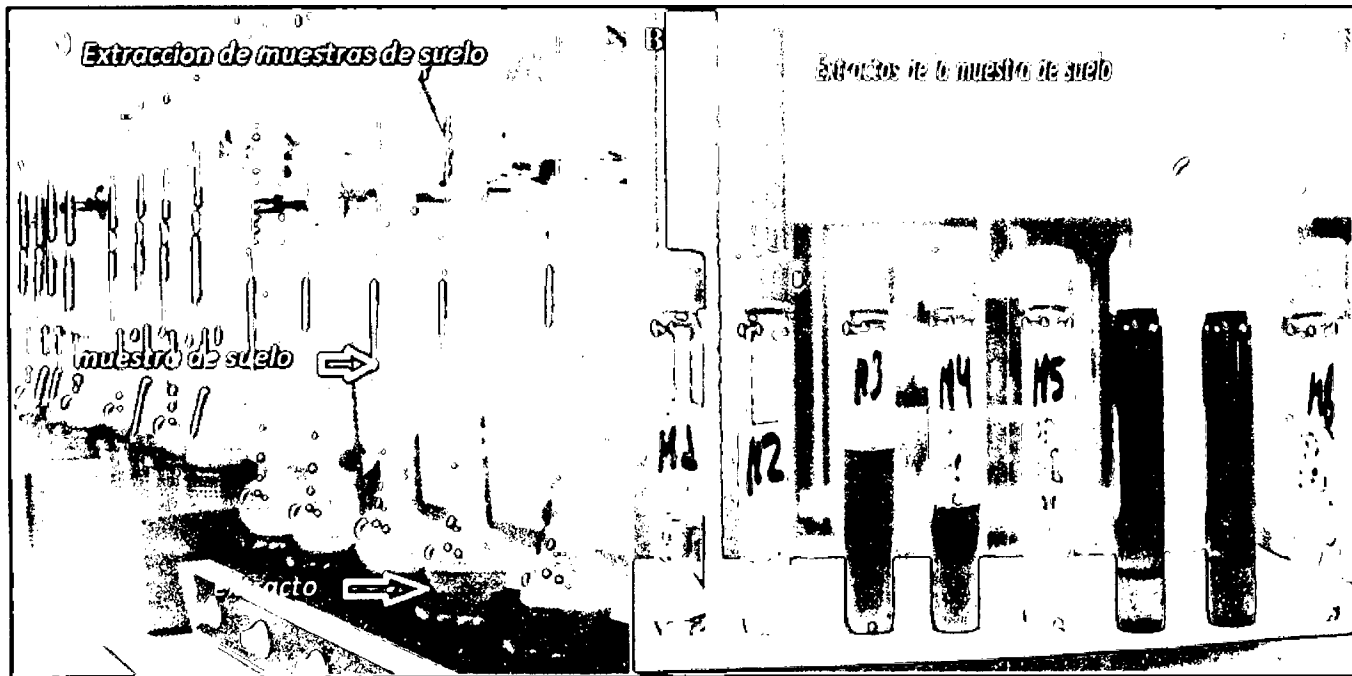


Figura IV.5 Extractos obtenidos para las muestras de suelo, A) material para la extracción en suelo, B) extractos obtenidos [32].

Dado que los hidrocarburos son compuestos mayormente no polares o son muy pocos solubles en el agua (tales como hidrocarburos alifáticos y aromáticos), se usó como solvente el diclorometano (poco polar), el cual actúa sobre el soluto, solvatándolo y venciendo las fuerzas intermoleculares (fuerzas de London) que lo mantienen unido, pero sin dar lugar a la reacción; es decir, las moléculas del soluto son rodeadas por las moléculas del solvente [43].

Desafortunadamente, en el proceso de extracción con el solvente (diclorometano), aparte de arrastrar los hidrocarburos de petróleo presentes en las muestras (agua y suelo), también son arrastrados compuestos orgánicos diferentes a los hidrocarburos, los cuales producen interferencia en la lectura cromatográfica y como resultado una sobreestimación en las concentraciones de TPH presentes en las muestras. Por lo cual, es importante el proceso de limpieza (clean up) para la determinación de las concentraciones de TPH (C10-C40) en las muestras ambientales [33].

B) Proceso de limpieza (clean-up)

En esta sección se describirá el procedimiento adecuado de limpieza (clean-up) para las muestras de agua y suelo muestreadas (ver tabla III.3.1).

Los extractos obtenidos presentan interferencia orgánica (ácidos grasos, lípidos y otros), lo cual sin pasar por el proceso del clean up, estos son detectados por el GC-FID y dan claras señales de interferencia. (Ver figura IV.6 y IV.7).

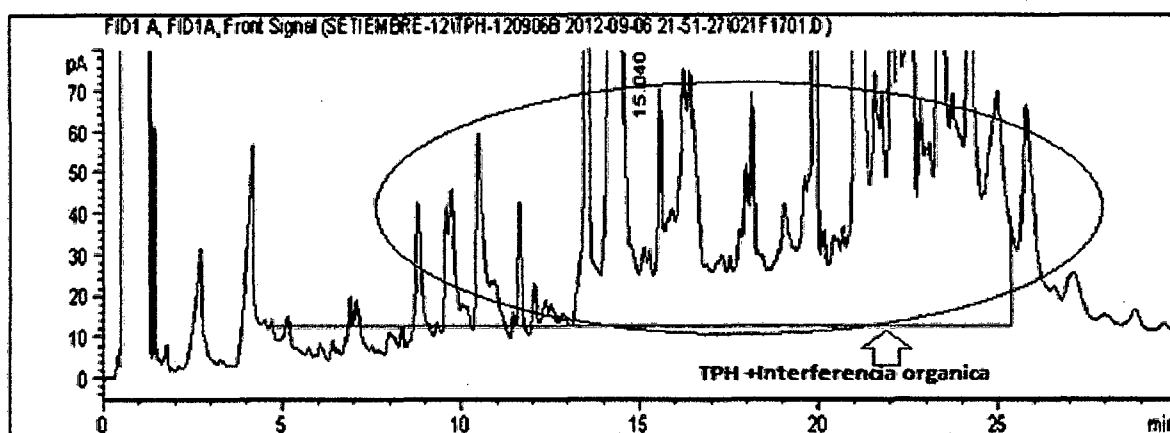


Figura IV.6 Cromatograma de TPH de la muestra M3A (tabla III.3.1)-cromatógrafo Agilent 7890N.

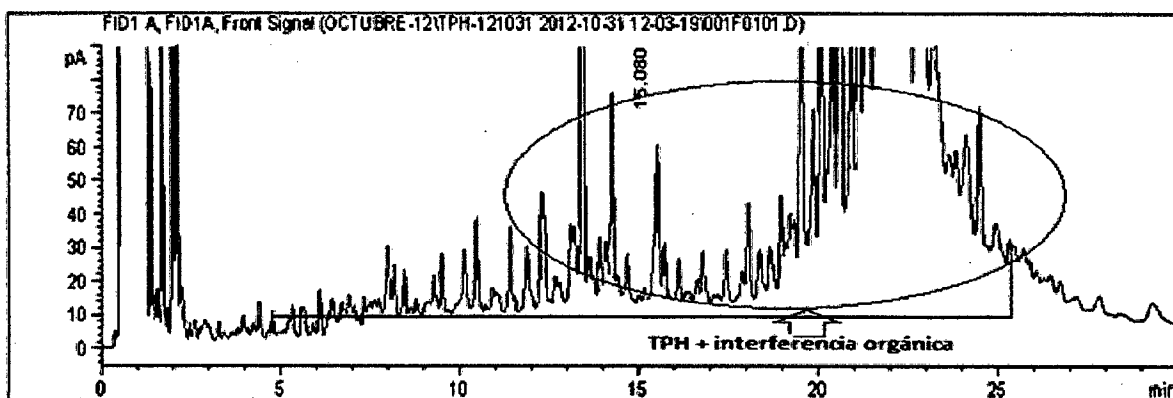


Figura IV.7 Cromatograma de TPH de la muestra M7 (tabla III.3.1)-cromatógrafo Agilent 7890N.

De los cromatogramas mostrados (M3A-muestra de agua y M7-muestra de suelo), si los comparamos con el cromatograma de un estándar de TPH (ver figura IV.2), ambas muestras presentan hidrocarburos de petróleo, pero como se observa (figura IV.6 y IV.7), estas presentan interferencia y no muestran una clara identificación visual de los hidrocarburos totales de petróleo y si los cuantificamos así como están, darán un resultado erróneo de TPH (C10-C40), por lo cual se desarrollaron 02 tipos de procedimiento para la limpieza (clean-up).

Los dos tipos de procedimientos para los clean-up de las muestras son: Procedimiento 1 y procedimiento 2 (ver tabla IV.5).

Tabla IV.5 Métodos para el proceso de limpieza (clean-up) [33, 34, 35].

Método de limpieza	Adsorbente empleado	Cantidad de adsorbente (g)	Tipo de Solvente	Volumen de Solvente(mL)
Procedimiento 1	Silica gel	10g	Pentano	25mL
			Diclorometano: pentano (2:3)	50mL
Procedimiento 2	Silica-NaOH 33% Silica-H ₂ SO ₄ 7% Fluorisil 5%	1g 2.2g 3g	Hexano	30mL

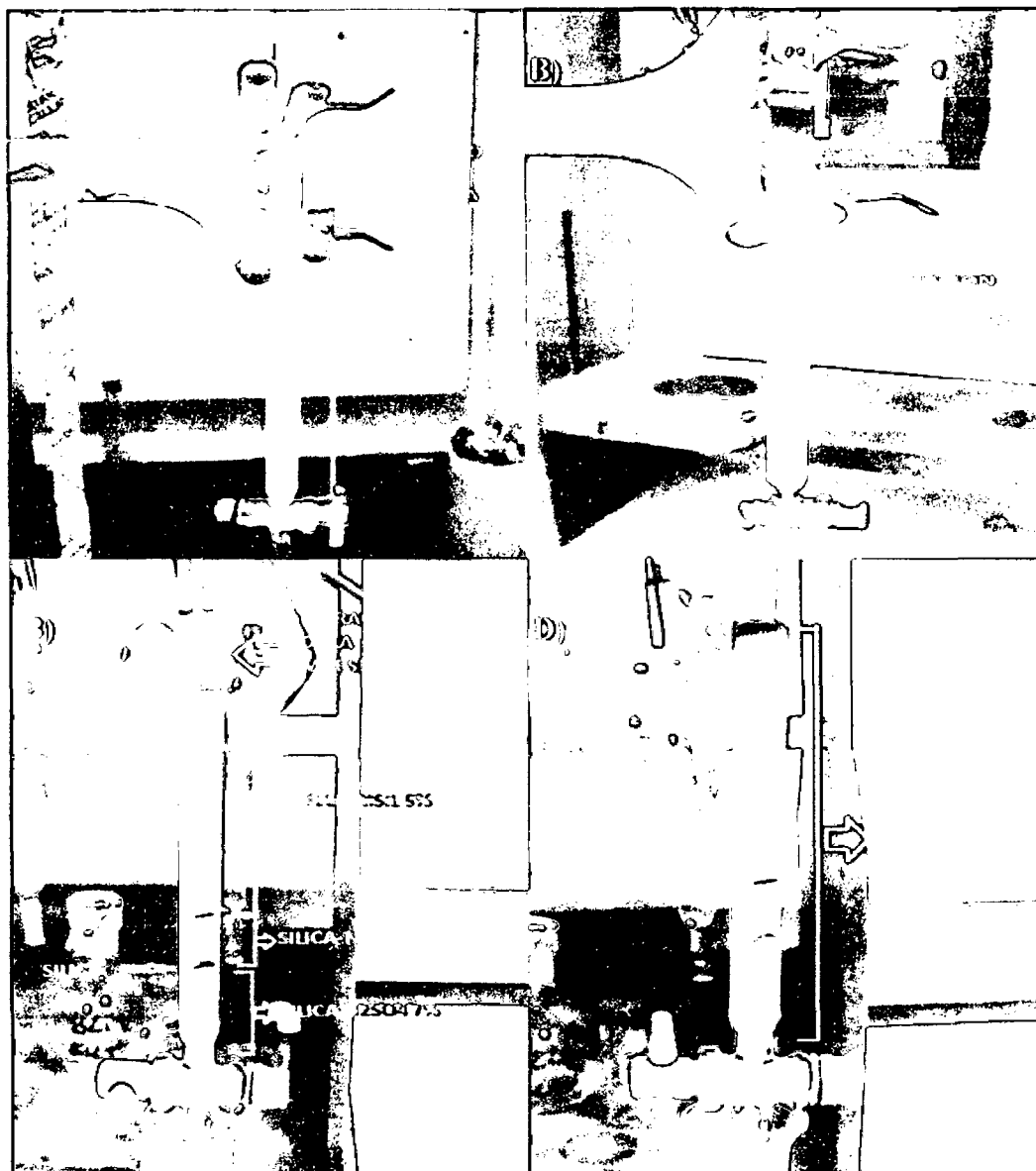


Figura IV.8 Preparación de la columna para el proceso de clean up: A y B) procedimiento 1 [34]; C y D) procedimiento 2 [33, 35].

En la figura IV.8 A y B representan al procedimiento 1, donde se muestra el llenado de la columna con sílica gel mas la adición del extracto de la muestra y la elución del extracto através de ella, respectivamente; en la figura IV.8 C y D representan al procedimiento 2, donde se muestra el llena de la columna con los adsorbente (fluorisil, sílica-NAOH y sílica- H_2SO_4) mas la adición del extracto de la muestra y la elución del extracto através de ella, respectivamente.

Para el desarrollo de este procedimiento (clean-up), se uso como equipo de lectura, al cromatógrafo Agilent-7890N.

Tabla IV.6 Método de Lectura para el cromatógrafo GC-Agilent 7890 N en el análisis de TPH (C10-C40).

Método de Lectura	Configuración	Muestras	Descripción
Método 2	Primera	Aguas y suelos	El desarrollo del método se realizó con el cromatógrafo de gases Agilent 7890N, perteneciente a la empresa Enviromental Laboratories SAC y el cual se uso para las lecturas cromatográficas, en el proceso de clean up.

Para la verificación de estas dos pruebas de clean-up, se realizó primeramente a un estándar certificado de hidrocarburos de petróleo de 500mg/L [2], para poder observar el porcentaje de recuperación de los hidrocarburos de petróleo, resultando así:

- Procedimiento 1 : %Recuperación TPH = 90.5%
- Procedimiento 2: %Recuperación TPH = 92%

El porcentaje de recuperación, para la obtención de los hidrocarburos totales de petróleo (C10-C40) en ambos procedimientos, es muy buena, pero se puede saber cuán eficiente es la limpieza de las interferencias orgánicas presentes en las muestras.

Se muestra los resultados (cromatogramas y concentraciones) de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (C10-C40), para las muestras M3A (muestra de agua) y M7 (muestra de suelo), realizados con los dos tipos de procedimientos de limpieza (1 y 2), con el propósito de obtener el procedimiento más eficiente para la eliminación de las interferencias orgánicas que puedan estar presentes en las muestras de agua y suelo (Ver figura IV.9 y figura IV.10), respectivamente.

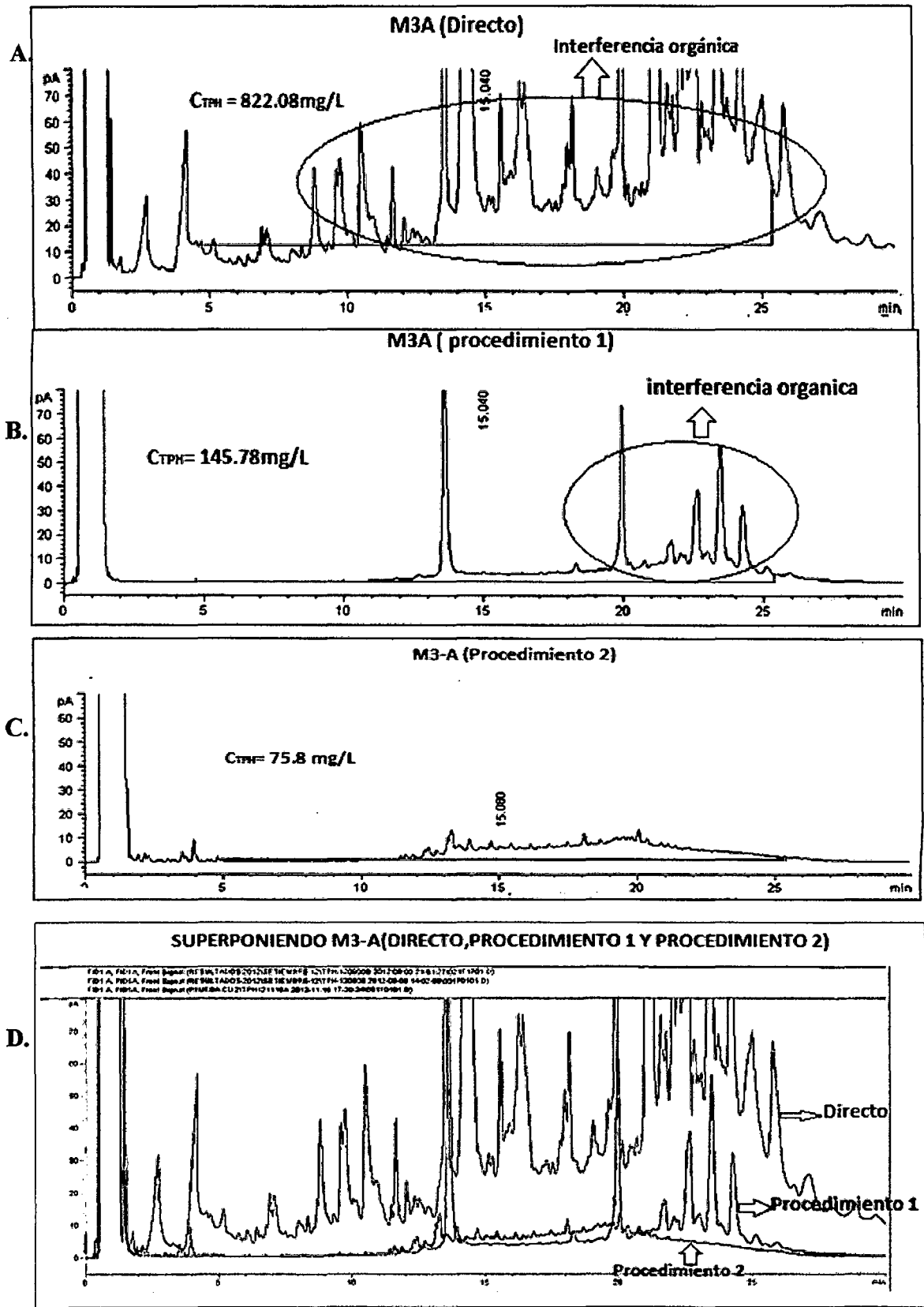


Figura IV.9 Comparación de los cromatogramas obtenidos en el GC-Agilent 7890 para los dos procedimientos de limpieza 1 y 2 en la muestra de agua: M3-A.

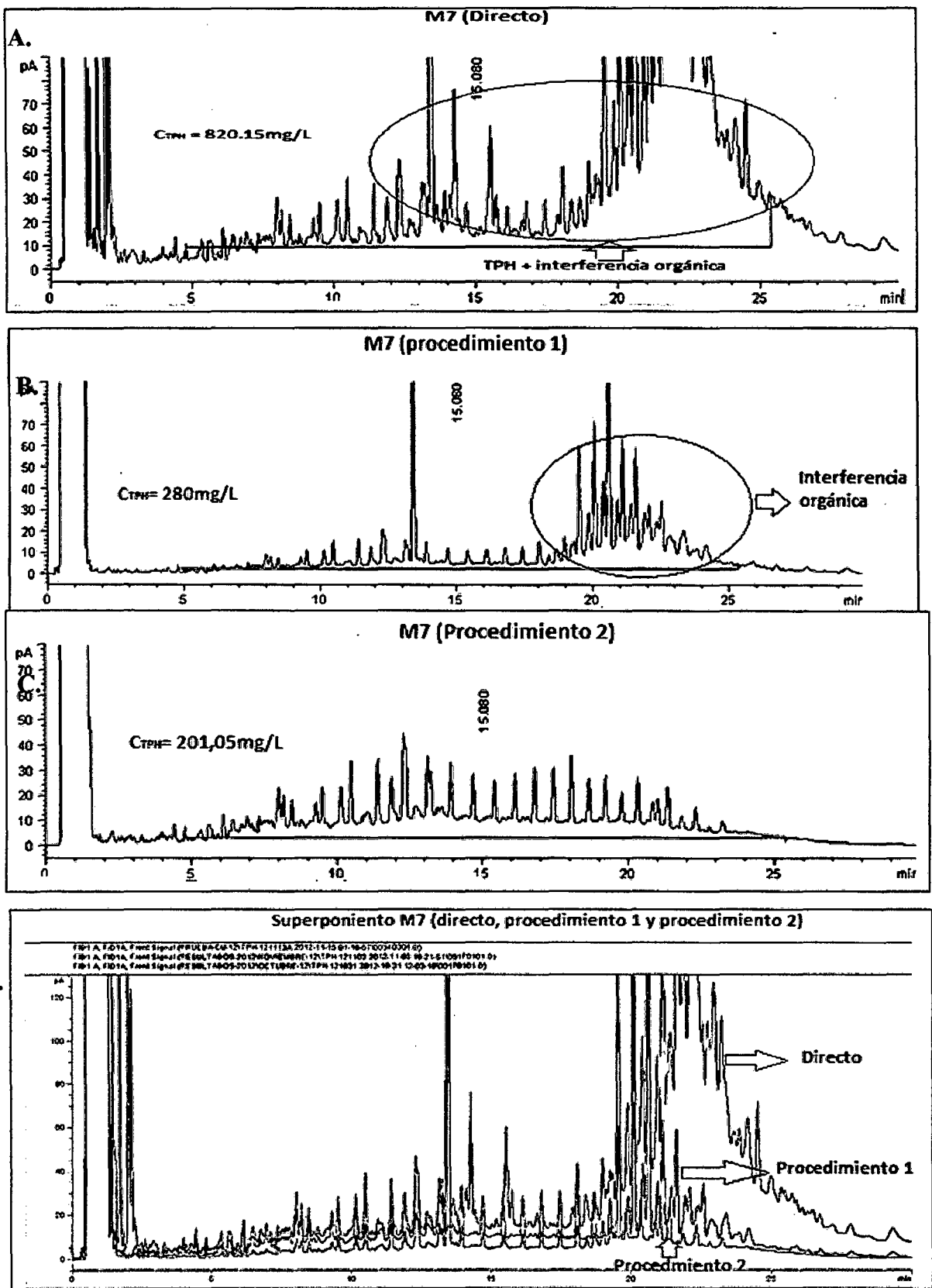


Figura IV.10 Comparación de los cromatogramas obtenidos en el GC-Agilent 7890 para los dos procedimientos de limpieza 1 y 2 en la muestra de suelo: M7.

De las Figuras se tiene:

Tabla IV.7 Resultados de TPH para las muestras M3-A (agua) y M7 (suelo) obtenidos a partir del cromatógrafo GC-Agilent 7890N.

Muestra	Concentración de TPH (C10-C40) (mg/L)		
	Sin Limpieza (Directo)	Con Limpieza	
		Procedimiento 1	Procedimiento 2
M3-A	822.08mg/L	145.78mg/L	75.8mg/L
M7	820.15mg/L	280mg/L	201.05mg/L

Como se observa en la tabla IV.7 y en las figuras IV9, IV10; la cuantificación de las muestras sin pasar por el proceso de limpieza, dan un resultado elevado de TPH, por el cual, el proceso de limpieza es muy importante para la determinación de los hidrocarburos de petróleo C10-C40.

De las pruebas realizadas, con los dos tipos de procedimientos de limpiezas, se puede observar que el procedimiento 2, con respecto al procedimiento 1, produce una mayor eficiencia en la limpieza de las interferencias orgánicas presentes en la muestra (ver figura IV.9, IV.10), por el cual la elección del material de limpieza (adsorbente) es crucial. Además, de la tabla IV.7 al comparar los resultados obtenidos con ambos procedimientos, para ambas muestras, se observa que con el procedimiento 1 todavía hay presencia de cierta interferencia orgánica (lípidos) (ver gráfica IV.9B y IV.10B), y el cual da todavía una elevada concentración de TPH presentes en la muestra; por lo cual es importante elegir el procedimiento adecuado para el proceso de limpieza (clean-up).

Mediante el uso del procedimiento 1[39], se observa todavía la presencia de interferencia orgánica (lípidos, ácidos grasos)(ver figura IV.9B, IV.10B), esto es debido a que la sílica gel retiene compuestos polares (lípidos polares), mientras que los compuestos no polares (hidrocarburos, lípidos no polares), eluyen con el pentano (disolvente no polar) y además,

debido a que se usa diclorometano: pentano (ver tabla IV.5) como solvente de elución, el diclorometano, que es poco polar, tiende a arrastrar compuestos poco polares, que han quedado retenido en la sílica gel, como son los lípidos polares [45,46].

Además la eficiencia de la limpieza con sílica gel no se puede mejorar mediante la desactivación del adsorbente. [45]

Para el procedimiento 2 [33, 35], en comparación al procedimiento 1[34], el uso de la multicapas en la columna (ver figura IV8.C), mejora la eliminación de la interferencia orgánica presente en la muestra (ver figura IV.9.C, IV10C), esto se debe a los diferentes tipos de adsorbentes usados en el proceso de limpieza, donde cada uno tiene un papel importante en la eliminación de los lípidos (interferencia orgánica).

El uso del fluorisil al 5%, se debe a que el fluorisil en su forma pura es demasiada activa y es necesaria su desactivación para reducir las interacciones específicas con los compuestos aromáticos presentes en la muestra, por el cual se trabajó con el fluorisil al 5% desactivada; al colocar primero al fluorisil al 5% en el llenado de la columna, de arriba hacia abajo (ver figura IV.8C) , los compuestos lípidos polares son retenidos por interacción polar con el fluorisil, pero también se da el caso que los lípidos pueden quedar retenidos por interacciones ácido/base de Lewis debido a sus grupos carbonilo electrofílico presentes en la moléculas [47]; pero al pasar el extracto por este adsorbente todavía se tiene la presencia de ciertas interferencias orgánicas (ácidos grasos, lípidos).

Luego en la parte básica de la columna (sílica impregnada con NaOH 33%)(ver figura IV.8C), el resultado de la adición de 1M de hidróxido de sodio es para la desactivación de la sílica y por lo tanto obtener una disminución en la retención de compuestos no polares [48], el aumento de la sílica básica en la columna no mejora la limpieza [33]; además, la parte básica reduce el porcentaje de ácido, que podrían estar presentes en el extracto, lo cual evitaría ventajosamente la obstrucción de la columna por residuos de combustión que se generaría cuando esta pasa por la parte ácida de la columna, lo cual mostraría varios picos pequeños en el cromatograma [47,48]

En la parte ácida de la columna (sílica impregnada con H₂SO₄ 7%), se da la eliminación de lípidos restantes, el cual se basa en la oxidación de los lípidos [49,50], en lugar que la

retención; esto se explica visualmente, cuando los lípidos eluyen através de la parte acida de la columna, se observa una película negra (ver figura IV.8.D) el cual es residuo quemado. Además al usar más cantidad de acido (ejemplo al 44% de H₂SO₄), los PAH's reaccionan con el acido sulfúrico generando acido sulfónico aromáticos policíclicos [51].

Por lo tanto, el procedimiento 2, es adecuado para la eliminación de las interferencias orgánicas (lípidos, ácidos grasos) presentes en la muestras de agua y suelo, y también es aceptable para la recuperación de los TPH (C10-C40). Aunque la recuperación de TPH para el procedimiento 1 es también aceptable, pero la eliminación de las interferencias orgánicas (lípidos) es deficiente, pero se podría usar cuando las concentraciones de las interferencias sean bajas.

IV.1.4 Cuantificación de las muestras trabajadas

Para la cuantificación de la muestras se uso el cromatógrafo GC-Varian 450C y para la verificación de los resultados se uso el cromatógrafo GC-Agilent 7890N.

Tabla IV.8 Criterios para la determinación de TPH (C10-C40) en el cromatógrafo GC- Varian 450C.

Método de lectura	configuración	Tipo de muestras	Tipo de limpieza
Método 1	primera	Agua y suelo	Procedimiento 2

Tabla IV.9 Criterios para la verificación de resultados en la determinación de TPH (C10-C40) con el cromatógrafo GC Agilent 7890N.

Método de lectura	configuración	Tipo de muestras	Tipo de limpieza
Método 2	primera	Agua y suelo	Procedimiento 2

Para la cuantificación de las muestras de agua y suelo, se determinara primero la concentración de TPH, presentes en el extracto, para lo cual se usara la Ec.16:

$$\text{Área } (\mu\text{V}\cdot\text{min}) = 52.244 \cdot \text{concentración del extracto } (\text{mg/L}) + 12500$$

Donde: el área es obtenida a partir de lecturas cromatográficas del GC-Varian 450C, ver tabla IV.10.

Tabla IV.10 Valores de las áreas de las muestras tomadas

Muestra	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{min}$)
M1	52251.3
M2	96315.1
M3	764653.7
M4	2623632,87
M5	16606.6
M6	17623.7
M7	22532.23
M8	47278.55
M1-A	17897.0
M2-A	50237.0
M3-A	16991.2
M4-A	17387.4
M5-A	37444.3

Tomando como ejemplo el primer valor de la Tabla IV.10, y la ecuación correspondiente a la gráfica del Área vs Concentración TPH (Ec.16), se calcula la concentración (mg/L o ppm) del extracto, de la siguiente manera:

✓ Para M1:

$$52251.3 = 52.244C_{\text{TPH-extracto}} + 12500$$

$$C_{\text{TPH-extracto}} = (52251.3 - 12500) / 52.244$$

$$C_{\text{TPH-extracto}} = 760.87 \text{ mg/L}$$

Pero la determinación de TPH (C10-C40) presente en la muestra está dado por la ecuación 17:

$$C_{\text{TPH}} = \frac{\text{Cextracto} \cdot \text{Vextracto (mL)}}{\text{Volumen inicial (mL)} \text{ ó } \text{Winicial (g)}}$$

Donde: $V_{inicial} = 1000\text{ml}$ (para aguas).

$W_{inicial} = 10\text{g}$ (para suelos).

$V_{extracto} = 5\text{mL}$. (Para todas las muestras).

Reemplazando en la ec.17, se tiene para la muestra M1 (suelo):

$$C_{TPH} = \frac{760.87 \frac{\text{mg}}{\text{L}} * 5\text{mL}}{10\text{g}}$$

$$C_{TPH} = 380.43 \text{ mg/kg}$$

Este es la concentración de hidrocarburos de petróleo (C10-C40) presentes en la muestra de suelo M1.

Se realiza el mismo cálculo para todas las muestras de agua y suelo (ver tabla III.3.1), obteniéndose así los valores que se presentan en las siguientes tablas:

Tabla IV.11 Valores de las concentraciones de TPH, presentes en las muestras trabajadas, obtenidas con el cromatógrafo GC- Varian 450C

Muestra	Tipo de muestra	Lectura del extracto(concentración) (mg/L)	Concentración de TPH en la muestra (C10-C40)
M1	Suelo	760.87	380.43 mg/Kg
M2	Suelo	1604.3	802.15 mg/Kg
M3	Suelo	14396.94	7198.47mg/Kg
M4	Suelo	49979.56	24989.8mg/Kg
M5	Suelo	78.6	39.3mg/Kg
M6	Suelo	98.07	49.03 mg/Kg
M7	Suelo	195.85	97.9mg/Kg
M8	Suelo	665.7	332.85mg/Kg
M1-A	Agua	103.3	0.52 mg/L
M2-A	Agua	722.32	3.61mg/L
M3-A	Agua	85.96	0.43 mg/L
M4-A	Agua	93.55	0.47 mg/L
M5-A	Agua	477.45	2.39 mg/L

La verificación de los resultados obtenidos para las muestras anteriormente, con el cromatógrafo GC-Varian 450, se realizó con el cromatógrafo de gases Agilent 7890N, pertenecientes a la empresa Environmental Laboratories SAC, y los criterios aplicados para la lectura se indica en la tabla IV.9.

Tabla IV.12 Verificación de las concentraciones de TPH presentes en las muestras trabajadas con el cromatógrafo GC Agilent 7890 N.

Muestra	Tipo de muestra	Concentración de TPH en la muestra (C10-C40) GC-Varian 450C	Concentración de TPH en la muestra (C10-C40) GC-Agilent 7890N
M1	Suelo	380.43 mg/Kg	369.6 mg/Kg
M2	Suelo	802.15 mg/Kg	802.31 mg/Kg
M3	Suelo	7198.47mg/Kg	7201.15mg/Kg
M4	Suelo	24989.8mg/Kg	25010.6mg/Kg
M5	Suelo	39.3mg/Kg	30.7mg/Kg
M6	Suelo	49.03 mg/Kg	50.73 mg/Kg
M7	Suelo	97.9mg/Kg	100.5mg/Kg
M8	Suelo	332.85mg/Kg	341.5mg/Kg
M1-A	Agua	0.52 mg/L	0.69 mg/L
M2-A	Agua	3.61mg/L	3.46mg/L
M3-A	Agua	0.43 mg/L	0.36mg/L
M4-A	Agua	0.47 mg/L	0.56mg/L
M5-A	Agua	2.39 mg/L	2.31mg/L

De la tabla IV.12 se tiene que el porcentaje de diferencia de los resultados obtenidos con el GC-Varian 450C con respecto al GC-Agilent 7890 N es mínima.

Las concentraciones de TPH, obtenidas de las muestras, fueron comparadas con los estándares de calidad ambiental establecidas por el MINAN [5], ver tabla IV .13.

Tabla IV.13 Comparación de las concentraciones de TPH presentes en la muestra s con las ECAs.

Muestras	tipo de muestras	Estándares de calidad ambiental (ECA)	Concentración TPH (C10-C40)
M1	Suelos	1200mg/Kg	380.43 mg/Kg
M2			802.15 mg/Kg
M3			7198.47mg/Kg
M4			24989.8mg/Kg
M5			39.7mg/Kg
M6			49.03 mg/Kg
M7			97.9mg/Kg
M8			332.85mg/Kg
M1-A	Aguas	0.2mg/L	0.52mg/L
M2-A			3.61mg/L
M3-A			0.43mg/L
M4-A			0.47mg/L
M5-A			2.39mg/L

De la Tabla de IV.13, las concentraciones de TPH (C10-C40) para las muestras M3, M4, M1A, M2A, M3A, M4A y M5A están por encima de los ECAs, lo cual indica que el lugar muestreado en estos puntos está contaminado por hidrocarburos totales de petróleo C10-C40.

IV.2 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos PAH's fueron análisis con un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS Shimadzu QP 2010) (ver anexo 5), pertenecientes a la empresa Enviromental Laboratories SAC.

Tabla IV.14 Metodología para el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) en el GC-MS Shimadzu QP2010.

Método de Lectura	Configuración	Tipo de Muestras	Tratamiento de la muestra		Observaciones
			Proceso de extracción	Proceso de Limpieza	
Método 3 (GC-MS)	Segunda	Aguas	Extracción liquido-liquido (EPA 3510C)	Procedimiento 2	Para el proceso de limpieza se uso el procedimiento 2, debido a que da una mejor limpieza (vista anteriormente).
		Suelo	Extracción solido-liquido (EPA 3540C)	Procedimiento 2	

El tratamiento de la muestra (ver tabla III.3.1) para la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's), para las muestras de agua y suelo en las industrias mineras, petroleras y otras, es el mismo que se utilizo para la determinación de los TPH.

Por lo tanto, la diferencia de los PAH's con los TPH es la lectura y configuración cromatográfica.

En este trabajo se realizara la determinación de 03 compuestos Aromáticos:

- Fenantreno.
- Pireno.
- Ben(a) antraceno.

IV.2.1 Cuantificación de las muestras trabajadas

Para la cuantificación se corrió primero un estándar certificado de PAH's (ver Anexo 3) de 0.2mg/L en el GC-MS, para la verificar la respuesta cuantitativa del GC-MS Shimadzu.

A continuación en la figura IV.11, se muestra la identificación de los 3 compuestos aromáticos a analizar en las muestras de agua y suelo.

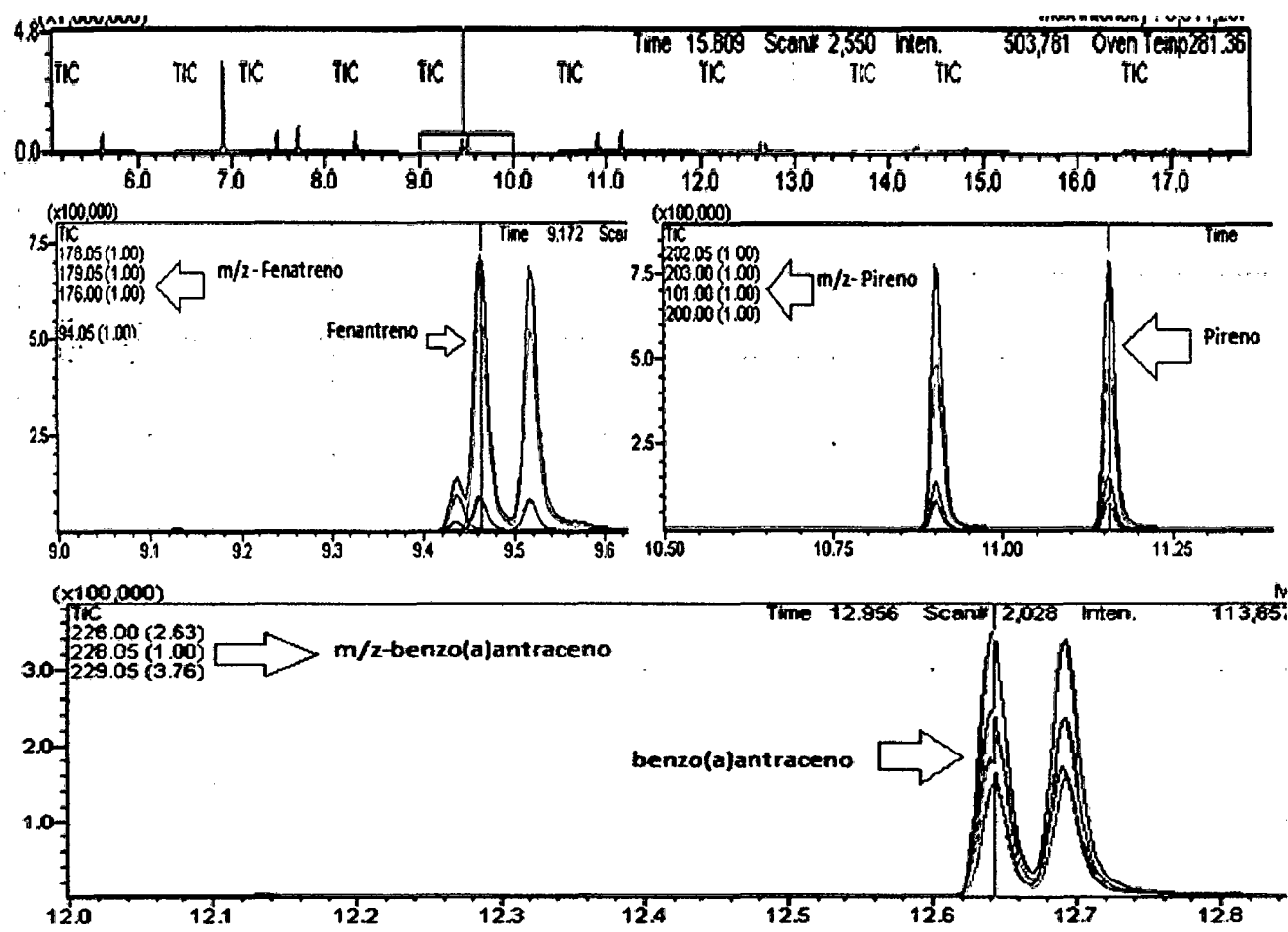


Figura IV.11 Cromatogramas de los 03 compuestos aromáticos a analizar en el GC-MS Shimadzu QP-2010.

En la tabla IV.15 se muestra la cuantificación del estándar certificado de PAH's de los 3 aromáticos policíclicos (fenantreno, pireno y benzo (a) antraceno), obtenidos a partir de la lectura realizada en el GC-MS QP 2010, donde la figura IV.11 muestra la identificación de los 03 compuestos aromáticos en el equipo.

Tabla IV.15 Resultados de los 3 compuestos aromáticos de 0.2mg/L obtenidos en el GC-MS Shimadzu QP 2010.

Analito	Tiempo de retención (min)	Masa/carga (m/z) del ion principal	Concentración (mg/L)
Fenantreno	9.172	178.05	0.2023
Pireno	11.16	202.05	0.2004
Benzo(a)antraceno	12.956	228.05	0.2024

Dado que la cuantificación de un estándar de PAH's de 0.2mg/L (ver tabla IV.15), para los 03 compuestos a analizar, es reproducible; se procede a la cuantificación de las muestras. En la tabla IV.16 se muestra los resultados de la cuantificación de las muestras (ver tabla III.3.1), obtenidas a partir del cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas GC-MS Shimadzu GC-QP 2010.

Tabla IV.16 Resultado de los 3 compuestos aromáticos presentes en las muestras trabajadas a partir del GC-MS QP2010.

Muestra	Tipo de muestra	Concentración del Fenantreno (mg/L)	Concentración del Pireno (mg/L)	Concentración del Benzo(a)antraceno (mg/L)
M1	Suelo	0.072 mg/Kg	0.134 mg/Kg	0.0676 mg/Kg
M2	Suelo	0.155 mg/Kg	0.345 mg/Kg	0.143 mg/Kg
M3	Suelo	2.179 mg/Kg	0.7734 mg/Kg	0.269 mg/Kg
M4	Suelo	6.78 mg/Kg	3.403 mg/Kg	1.916 mg/Kg
M5	Suelo	ND	ND	ND
M6	Suelo	ND	ND	ND
M7	Suelo	ND	ND	ND
M8	Suelo	0.056 mg/Kg	0.079 mg/Kg	0.0588 mg/Kg
M1-A	Agua	ND	ND	ND
M2-A	Agua	0.06 mg/L	0.244 mg/L	0.066 mg/L
M3-A	Agua	ND	ND	ND
M4-A	Agua	ND	ND	ND
M5-A	Agua	0.034 mg/L	0.183 mg/L	0.0494 mg/L

Donde:

➤ ND : analito no detectado

Las concentraciones de los 3 compuestos aromáticos, obtenidas de las muestras trabajadas agua y suelo (ver tabla III.3.1), fueron comparadas con los estándares de calidad ambiental establecidas por el MINAN [5], donde:

- El ECA para suelo (PAH's) es de 0.7mg/Kg.
- El ECA para agua (PAH's) es de 0.007mg/L.

Al comparar los resultados obtenidos con los ECAs, se observa que las muestras M3, M4, M2A y M5A, tienen concentraciones mayores a los ECAs, lo cual fueron establecidas por el MINAN, por lo cual existe un nivel de contaminación por parte de estos tres compuestos aromáticos, en las zonas muestreadas en estos puntos.

IV.3 RESUMEN DE RESULTADOS

IV.3.1 Determinación de los hidrocarburos totales de petróleo (C10-C40).

Para la determinación de los TPH, se consideró lo siguiente:

Tabla IV.17 Metodología para el análisis de TPH (C10-C40) para el cromatógrafo de gases GC-Varian 450C.

Método de Lectura	Configuración	Tipo de Muestras	Tratamiento de la muestra	
			Proceso de extracción	Proceso de Limpieza
Método 1 (GC-Varian 450C)	Primera	Aguas	Extracción líquido-líquido (EPA 3510C)	Procedimiento 2
		Suelo	Extracción sólido-líquido (EPA 3540C)	Procedimiento 2

Haciendo uso de estas consideraciones, se realizó la cuantificación de TPH para las muestras de agua y suelo, ver tabla IV.18.

Además las concentraciones obtenidas en las muestras fueron comparados con los ECAs [5], para ver si dichos puntos de muestreo tiene un nivel de contaminación positivo (concentración de TPH > ECA), ver tabla IV.18.

Tabla IV.18 Concentración de TPH (C10-C40), presentes en las muestras trabajadas, obtenidas con el cromatógrafo de gases GC-Varian 450C.

Muestras	tipo de muestras	Estándares de calidad ambiental (ECA)	Concentración TPH (C10-C40)	Nivel de contaminación
M1	Suelos	1200mg/Kg	380.43 mg/Kg	<1200
M2			802.15 mg/Kg	<1200
M3			7198.47mg/Kg	Positivo
M4			24989.8mg/Kg	Positivo
M5			39.7mg/Kg	<1200
M6			49.03 mg/Kg	<1200
M7			97.9mg/Kg	<1200
M8			332.85mg/Kg	<1200
M1-A	Aguas	0.2mg/L	0.52mg/L	Positivo
M2-A			3.61mg/L	Positivo
M3-A			0.43mg/L	Positivo
M4-A			0.47mg/L	Positivo
M5-A			2.39mg/L	Positivo

IV.3.2 Determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's)

En este trabajo, se analizaron 3 hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) que fueron fenantreno, pireno y benzo(a) antraceno por la disponibilidad de estándares. Con este propósito, se consideró la metodología mostrada en la tabla IV.19:

Tabla IV.19 Metodología para el análisis de los PAH's en el GC-MS QP2010.

Método de Lectura	Configuración	Tipo de Muestras	Tratamiento de la muestra	
			Proceso de extracción	Proceso de Limpieza
Método 3 (GC-MS Shimadzu QP2010)	Segunda	Aguas	Extracción líquido-líquido (EPA 3510C)	Procedimiento 2
		Suelo	Extracción sólido-líquido (EPA 3540C)	Procedimiento 2

De las muestras trabajadas (ver tabla III.3.1), resultó que las muestras designadas como M3, M4, M2A y M5A, mostró la presencia de los 3 compuestos aromáticos policíclicos a analizar (fenantreno, pireno y benzo(a) antraceno), que se detectaron con el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas GC-MS QP2010, pertenecientes a la empresa Enviromental Laboratories SAC. (Ver tabla IV.20)

Tabla IV.20 Concentración de fenantreno, pireno y benzo(a) antraceno presentes en las muestras trabajadas

Muestra	Tipo de muestra	Concentración del Fenantreno (mg/L)	Concentración del Pireno (mg/L)	Concentración del Benzo(a)antraceno (mg/L)
M3	Suelo	2.179 mg/Kg	0.7734 mg/Kg	0.269 mg/Kg
M4	Suelo	6.78mg/Kg	3.403 mg/Kg	1.916 mg/Kg
M2-A	Agua	0.06 mg/L	0.244 mg/L	0.066 mg/L
M5-A	Agua	0.034 mg/L	0.183 mg/L	0.0994 mg/L

Los resultados obtenidos (ver tabla IV.20, se comparó con los ECAs del Ministerio del Ambiente MINAN [5], donde se puede apreciar un nivel positivo de contaminación por parte de los tres compuestos aromáticos mencionados. Ver tabla IV.21.

Tabla IV.21 Comparación de las concentraciones obtenidas de los PAH's, en las muestras trabajadas, con los ECAs-nivel de contaminación.

Compuesto Aromático	Estándares de calidad ambiental (ECA)	Nivel de contaminación			
		M3	M4	M2-A	M5-A
Fenantreno	0.7 mg/Kg (suelo) 0.007mg/L(agua)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Pireno	0.7 mg/Kg (suelo) 0.007mg/L(agua)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Benzo(a)antraceno	0.7 mg/Kg (suelo) 0.007mg/L(agua)	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

V. CONCLUSIONES y RECOMENDACIONES

V.1 CONCLUSIONES

1.- En esta trabajo se ha implementado métodos cromatográficos con configuraciones específicas para el análisis de hidrocarburos Totales de petróleo C10-C40 (TPH) y la determinación de los compuestos aromáticos más comunes en estas muestras (fenantreno, pireno y benzo(a)antraceno), así como, métodos de lectura para cada caso en la se especifican las condiciones experimentales de los parámetros cromatográficos. Para la cuantificación se ha procedido a la preparación de patrones estandarizados.

2.-Se han analizado muestras de suelos procedentes de centros mineras como Minera Gold Field la Cima, SS Traders Markers y asientos petroleros como Corporación petrolera Talisman y Petroperú, encontrándose diferentes concentraciones de TPH, de acuerdo al lugar de procedencia. En los centros petroleros se encontró mayor presencia de TPH tanto en las muestras de agua como en el suelo, respecto a los centros mineros, con un promedio de 9000 ppm mientras que en los centros mineros fue de 500 ppm. En el caso de los centros petroleros, estos valores han sobrepasado los valores de la ECAs (estándares de calidad ambiental) establecidas por el Ministerio del Ambiente, que para el caso de suelos fue de 1200 ppm de TPH. Se han analizado también muestras de aguas procedentes de centros mineros como Minera Gold Field La Cima, Xstrata Corporation y asientos petroleros como Petroperú, encontrándose diferentes concentraciones de TPH. En este caso, las concentraciones de TPH en los centros petroleros fue de 3 ppm mientras que en los centros mineros fue de 0.4 ppm. En los centros petroleros, los valores de TPH en aguas superan los ECAs dadas por el MINAN, que para el caso es de 0.2 ppm.

3.- Se han detectado también en las muestras anteriormente mencionadas, la presencia de tres compuestos aromáticos (PAH)s: fenantreno (C14), pireno (C16) y benzo(a)antraceno (C18); para las muestras de suelos en los centros petroleros tuvieron un valor promedio de 4ppm, 2ppm y 1ppm, respectivamente, mientras que en los centros mineros no se detectó la presencia de estos 3 compuestos aromáticos y para las muestras de agua, en los centros petroleros tuvo un valor promedio de 0.045ppm, 0.15ppm y 0.08ppm, respectivamente, mientras que en los centros mineros no se detectó la presencia de estos 3 compuestos aromáticos. En ambos casos, las muestras provenientes de centros petroleros han superado

los valores de ECAs establecidas por el Ministerio del Ambiente (MINAN), que para el caso muestras de suelo es de 0.7ppm y para muestras de agua, de 0.007ppm.

V.2 RECOMENDACIONES

1. Los valores de TPH son actualmente controlados por el Ministerio del Ambiente através de la OEFA (organización de evaluación y fiscalización ambiental), la cual tiene la responsabilidad de exigir a las empresas a que cumplan con los ECAs. Dicha organización exige a las empresas realizar monitoreos ambientales en forma periódica, afin de que si resultara un valor positivo de TPH en el medio, la empresa debe eliminar o remediar dichas concentraciones presentes en el medio afectado. al procedimiento de remediación ampliamente usado en suelos contaminados es la tecnología de Landfarming, el cual reduce las concentraciones de hidrocarburos através de la biodegradación, y para el caso de aguas contaminadas el procedimiento de remediación es el tratamiento por reinyección.

2. Para el caso de los hidrocarburos aromáticos, también están controlados por el MINAN através de la OEFA y el proceso de remediación es el mismo que se da para los TPH, debido a que los PAH's están involucrados dentro de los TPH, aunque se puede considerar otras técnicas de remediación como son: técnicas de Extracción del Vapor del Suelo (EVS), Bioventilación, Biopila y Mitigación Natural.

VI. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

BIBLIOGRAFIA

1. Fingas, M. & Wang, Z., "Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography", *Journal of Chromatography A*, 774, 51- 78 (1997).
2. Meador, J.P., Stein J, E., Reichert W.L., Varanasi, U. Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Marine Organisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 143: 79-165, (1995).
3. Antizar - Ladislao, B. Polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, phthalates and organotins in northern Atlantic Spain's coastal marine sediments. *Journal of Environmental Monitoring*, 11:85-91, (2009).
4. www.atsdr.cdc.gov/es/, diciembre 2001, consultado el 15.12.12.
5. http://www.minem.gob.pe/descripcion.php?idSector=5&idTitular=713&idMenu=su_b550&idCateg=378, consultado el 20.12.12.
6. Environmental Protection Agency, Method EPA 8015C., "Nonhalogenated Organics Using GC/FID" Rev. 3, February 2007
7. Robert L. Grob, Eugen F. Barry., *Modern Practice of Gas Chromatography*, fourth edition. USA. 2004.
8. Ian A. Fowles, *Gas Chromatography*, second edition, UK, 1995.
9. Weisman W. *Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media*. Vol. 1. Total Petroleum hydrocarbon criteria working group series. United, 1998.
10. Skoog D. , *Principios de analisis instrumental*, México: Cengage learning, capítulo 27 (2008).
11. Law, R.J., Klungsoyr, J., The analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine samples. *International Journal of Environmental and Pollution*, 13:262-283, (2000).
12. R.G. Mathews, J. Torres and R.D. Schwartz, Separation of Aromatic Hydrocarbon Mixtures by Glass Capillary Column GC, *Journal of Chromatographic Science*, Volume 20, Issue 4, Pag. 160-164.
13. Brooke, L.T. Conducting toxicity tests with freshwater organisms exposed to dieldrin, fluoranthene, and phenanthrene. Environmental Research Laboratory, USA, 1993.

14. [http:// www.iaea.org.ar/archivos/educ9.pdf](http://www.iaea.org.ar/archivos/educ9.pdf). consultado 03.01.2013.
15. [http:// www. Osinerg. Gob. Pe/ newweb/pages/GFH/1140.htm](http://www.Osinerg.Gob.Pe/newweb/pages/GFH/1140.htm)., consultado el: 11.01.2013.
16. Neff, J.M., J.W. Anderson, B.A. Cox, R.B. Laughlin, Jr., S.S. Rossi, and H.E. Tatem. Effects of petroleum on survival, respiration and growth of marine animals. 1976 Pages 515-539.
17. <http://www.minem.gob.pe/descripcion.php?idSector=5&idTitular=713&idMenu=su b550&idCateg=378>. , citado el: 14 de mayo del 2008.
18. Borrás Carnero, Gonzalo., Efectos de los Hidrocarburos en la Salud Humana, 2009, http://webs.uvigo.es/h06/webh06/tsfp/es-en/efectos_es.html
19. Grob L. Robert, Barry F. Eugene, Modern Practice of Chromatography, Fourth Edition, USA: Wiley Interscience, 2004.
20. Colin F. Poole, The Essence of Chromatography, First Edition, the Netherlands, 2003.
21. Marian Kamiński, Joanna Gudebska, Tadeusz Górecki, Rafal Kartanowicz, Optimized conditions for hydrocarbon group type analysis of base oils by thin-layer chromatography–flame ionization detection, Journal of Chromatography A, Vol. 991, pag.255-266 (2003).
22. Shijie Wang, Guanlin Guo, Zengguang Yan, Guilan Lu, Qunhui Wang, Fasheng Li ,The development of a method for the qualitative and quantitative determination of petroleum hydrocarbon components using thin-layer chromatography with flame ionization detection, Journal of Chromatography A, Vol. 1217, Pag. 368-374, 2010.
23. Robert Stevenson, Rapid Separation of Petroleum Fuels by Hydrocarbon Type, Journal of Chromatographic Science, Volume 9, Issue 5, Pag. 257-262.
24. Zhendi Wang, Merv Fingas , Developments in the analysis of petroleum hydrocarbon in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography ,Journal of Chromatography A, Vol. 774, pag. 51-78, 1997.
25. M. Novotny, M.L. Lee, K.D. Bartle, The Methods for Fractionation, Analytical Separation and Identification of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Complex Mixtures, Journal of Chromatographic Science, Volume 12, Issue 10, pag. 606-612.
26. Raymond P.W. Scott, Chromatography Detectors, First Edition, USA: Marcel Dekker, 1996.

27. H Van den Dool, P Dec Kratz, A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography, *Journal of Chromatography A*, Pag. 463–471, 1963.
28. Zhendi Wang, Merv Fingas, Ken Li, Fractionation of a Light Crude Oil and Identification and Quantitation of Aliphatic, Aromatic, and Biomarker Compounds by GC-FID and GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*. Volume 32. Issue 9. Pag. 367-382.
29. M.L. Gay, A.A. Belisle, J.F. Patton, Quantification of petroleum-type hydrocarbons in avian tissue, *Journal of Chromatography A*, vol. 187, Issue 1, January 1980, Pag. 153-160.
30. John T. Tanacredi, Petroleum Hydrocarbons from effluents: detection in marine environment, *Journal (Water Pollution Control Federation)*, Vol. 49, Issue 2, pag. 216
31. Environmental Protection Agency, Method EPA 3510C, Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction, Rev. 3, December 1996.
32. Environmental Protection Agency, Method EPA3540C, Soxhlet Extraction, Rev. 3, December 1996.
33. Barry Muijs, Michiel T.O. Jonker, Evaluation of clean-up agents for total petroleum hydrocarbon analysis in biota and sediments, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1216, pag. 5182-5189, 2009.
34. Washington State Department of Ecology Toxics Cleanup Program And The Ecology Environmental laboratory, Analytical Methods for Petroleum Hydrocarbons: Method for the determination of extractable petroleum hydrocarbons (EPH) fractions, June 1997, pag. 68-102.
35. Method ISO 9377-2, Determination of hydrocarbons oil index-Method using solvent extraction and gas chromatography, First edition, 2000, pag. 6-10.
36. Environmental Protection Agency. Method EPA 8270D. Semivolatile Organic Compounds. By Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS), Rev. 4, February 2007
37. [http:// www. osinerg. gob. pe/ newweb/pages/GFH/1140.htm.](http://www.osinerg.gob.pe/newweb/pages/GFH/1140.htm), citado el: 2 de setiembre del 2011.
38. [http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio//es_ES//investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf.](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio//es_ES//investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf), citado el 26 de setiembre del 2011.

39. Environmental Protection Agency, Method EPA 8000C, Determinative Chromatographic Separations, Revision 3. March 2003.
40. Catalog Restek, Chromatography products, 2009, pag. 103-107.
41. Catalog Agilent Technologies, The Essential Chromatography and Spectroscopy catalog, 2010, pag. 238-241.
42. Catalog Supelco Analytical, Chromatography products for Analysis and Purification, 2009, pag. 355-359.
43. W.E. May, S.N. Chesler, S.P. Cram, B.H. Gump, H.S. Hertz, D.P. Enagonio and S.M. Dyszel, Chromatographic Analysis of Hydrocarbons in Marine Sediments and Sea Water, *Journal of Chromatographic Science*, Volume 13, Issue 11, pag. 535-540.
44. G.S. Frysiner, R.B. Gaines, L. Xu, C.M. Reddy, Resolving the unresolved complex mixture in petroleum-contaminated sediments, *Environmental Science Technology*, 37(8), April 2003, 1653-62.
45. W.W. Christie, *Lipid Analysis*, second ed., Pergamon Press, Oxford, 1982.
46. P.W. Albro, J.L. Schroeder, J.T. Corbett, Lipids of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Lipids* 27, Feb. 1992, 136-43.
47. G. S. Douglas, K. J. McCarthy, D. T. Dahlen, J. A. Seavey, W. G. Steinhauer, R. C. Prince. D. L. Elmendorf. The use of hydrocarbon analyses for environmental assessment and remediation, *Journal of Soil Contamination*, Vol. 1, Issue 3, 1992, pag. 197-216.
48. L.K. Tan, A.J. Liem, Evaluation of Column Cleanup for Chlorobenzene, Polychlorinated Biphenyls, Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins, and Polychlorinated Dibenzofurans in MM5 flue Gas Analysis, *Analytical Chemistry*, Jan. 1998, 70(1): 191-8.
49. Durand, V. Ruban, A. Amblés, J. Oudot, Characterization of the organic matter of sludge: determination of lipids, hydrocarbons and PAHs from road retention/infiltration ponds in France, *Environmental Pollution*, vol. 132, Issue 3, December 2004, pag. 375-384.
50. M. Aceves, J. Grimait, J. Albaiges, F. Broto, L. Comellas, M. Gassiot, Analysis of hydrocarbons in aquatic sediments : II. Evaluation of common preparative procedures for petroleum and chlorinated hydrocarbons, *Journal of Chromatography A*, vol. 436, pag. 1988-503-509.

51. Kenneth Ogan, Elena Katz, Walter Slavin, Concentration and Determination of Trace Amounts of Several Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aqueous Samples, *Journal of Chromatographic Science*, Volume 16, Issue 11, Pag. 517-522.
52. D. L. Camin, A. J. Raymond, Chromatography in the Petroleum Industry, *Journal of Chromatographic Science*, Volume 11, Issue 12, Pag. 625-638.
53. M. Bernabei, R. Reda, R. Galiero, G. Bocchinfuso, Determination of total and polycyclic aromatic hydrocarbons in aviation jet fuel, *Journal of Chromatography A*, vol. 985. pag. 197-203. 2003.

VII.ANEXOS

ANEXO 1: Composición de los hidrocarburos (ventana de integración) usada para el método 1.



CERTIFICATE OF COMPOSITION

FOR LABORATORY USE ONLY - READ MSDS PRIOR TO USE

110 Benner Circle
Bellefonte, PA 16823-8812
Tel: (800) 356-1688
Fax: (814) 353-1309

Catalog No.: 31674 Lot No.: AQ50126
Description: ASTM D2887-01 Calibration Mix, 1% wt/wt
Expiration Date: March 2014 Storage: Room Temperature

Elution Order	Compound	CAS#	Percent Purity ²	Concentration ³	Percent Uncertainty ⁴
1	n-Pentane (C5)	109-66-0	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
2	n-Hexane (C6)	110-54-3	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
3	n-Heptane (C7)	142-82-5	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
4	n-Octane (C8)	111-65-9	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
5	n-Nonane (C9)	111-84-2	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
6	n-Decane (C10)	124-18-5	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
7	n-Undecane (C11)	1120-21-4	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
8	n-Dodecane (C12)	112-40-3	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
9	n-Tetradecane (C14)	629-59-4	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
10	n-Pentadecane (C15)	629-62-9	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
11	n-Hexadecane (C16)	544-76-3	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
12	n-Heptadecane (C17)	629-78-7	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
13	n-Octadecane (C18)	593-45-3	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
14	n-Eicosane (C20)	112-95-8	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
15	n-Tetracosane (C24)	646-31-1	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
16	n-Octacosane (C28)	630-02-4	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
17	n-Dotriacontane (C32)	544-85-4	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
18	n-Hexatriacontane (C36)	630-06-8	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
19	n-Tetracontane (C40)	4181-95-7	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
20	n-Tetratetracontane (C44)	7098-22-8	99%	1 wt /wt %	+/- 0.01
Solvent: Carbon Disulfide		75-15-0	99%		

Column:
30m x .25mm x .25um
Rtx-5 (cat.#10623)

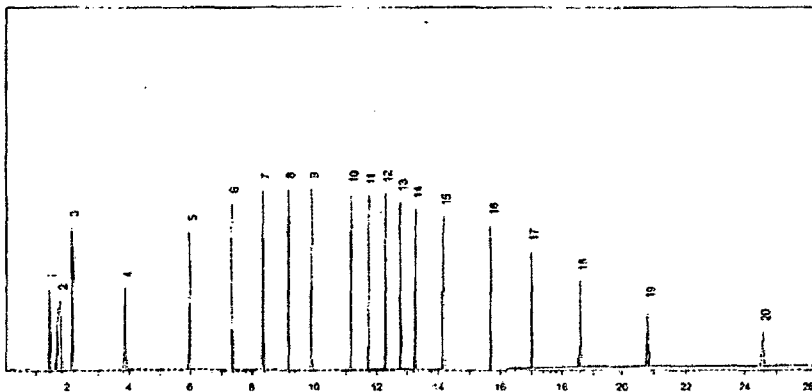
Carrier Gas:
hydrogen @ 40cm/sec

Temp. Program:
40°C (hold 4 min.) to 350°C
@ 25°C/min (hold 10 min.)

Inj. Temp:
250°C

Det. Temp:
300°C

Det. Type:
FID



Manufactured By: N/A

John Lidgett
John Lidgett - QA Analyst

1 Expiration date of the unopened ampul stored at recommended temperature.
2 Purity was determined by one or more of the following techniques: GC/FID, HPLC, GC/ECD, GC/MS. Value rounded to the nearest LOWER whole percentage. In addition to detectors listed above, chemical identity and purity are confirmed using 1 or more of the following: MS, DSC, solid probe MS, GC/FPD, GC/NPD, GC/TC, FTIR, melting point, refractive index, and Kan Fisher. See data pack or contact Restek for further details.
3 Based upon gravimetric preparation with balance calibration verified using NIST traceable weights (7 mass levels)
4 Percent Uncertainty based upon balance AND ASTM Class A volumetric glassware accuracy



Certificate of Analysis

NSI Solutions, Inc. • 7212 ACC Blvd • Raleigh, NC 27617 • 1-800-234-7837

Mixture Name: Diesel Fuel No. 2
Lot Number: UST-145-22

Expiration Date: 06/14
Solvent: Methylene chloride
(CARCINOGEN, IRRITANT)

COMPOUND NUMBER	ANALYTE	PURITY (%)	GRAVIMETRIC CONCENTRATION (µg/mL)
V4-1306 Blend	Diesel Fuel No. 2	100.0	50004

PREPARATION: Reported concentration value has been corrected for purity. Concentration is calculated from w/w or w/vol measurements using microbalances calibrated with NIST traceable weights and/or ASTM Class A volumetric glassware or calibrated equivalent labware.

STORAGE & HANDLING: Store at room temperature.



Kristi Becht, Organic Chemist

ANEXO 3: Certificado del estándar de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Certificate of Analysis

NSI Solutions, Inc. • 7212 ACC Blvd. • Raleigh, NC 27617 • 1-800-234-7837

Aromatic Hydrocarbon Std. (Mass)

Catalog Number: UST-250
 Lot Number: 010813
 Manufacture Date: 01/08/13
 Certified Date: 01/11/13

Expiration: 01/31/2021
 Solvent: Methylene chloride
 Hazards: Carcinogen, Irritant

<u>Analyte Number</u>	<u>Analyte</u>	<u>CAS</u>	<u>Analyte Purity</u>	<u>Certified Concentration (ug/mL)</u>
W-01-07	Acenaphthene	83-32-9	99.80%	1000 ± 1.19
W-75-20	Acenaphthylene	208-96-8	99.13%	1000 ± 1.19
W-76-02	Anthracene	120-12-7	99.91%	1000 ± 1.19
W-70-14	Benzo(a)anthracene	56-55-3	98.96%	1000 ± 3.79
W-71-19	Benzo(a)pyrene	50-32-8	99.93%	1000 ± 1.39
W-72-16	Benzo(b)fluoranthene	205-99-2	99.35%	1000 ± 1.22
W-73-14	Benzo(k)fluoranthene	207-08-9	99.96%	1000 ± 1.19
W-77-13	Benzo(g,h,i)perylene	191-24-2	99.56%	1000 ± 1.19
W-74-12	Chrysene	218-01-9	99.97%	1000 ± 1.19
W-231-21	Dibenz(a,h)anthracene	53-70-3	99.97%	1000 ± 1.19
W-37-04	Fluoranthene	206-44-0	99.82%	1000 ± 1.19
W-78-05	Fluorene	86-73-7	98.04%	1000 ± 1.22
W-81-20	Indeno(1,2,3-c,d)pyrene	193-39-5	99.69%	1000 ± 1.85
W-53-04	Naphthalene	91-20-3	99.76%	1000 ± 1.19
W-79-11	Phenanthrene	85-01-8	99.20%	1000 ± 1.19
W-82-08	Pyrene	129-00-0	99.65%	1000 ± 1.27
W-562-03	2-Methylnaphthalene	91-57-6	99.87%	1014 ± 0.665

Packaging, Storage, Instructions For Use

This reference material (RM) is packaged in a flame-sealed ampule and must be stored at 20-30°C. A minimum sampling size of 50 uL should be used. Smaller volumes may negatively affect estimated uncertainty.

To use this RM, allow it to reach room temperature. Mix it gently by inversion. Inspect for precipitate. If present, sonicate for a few minutes to redissolve. Open the ampule and withdraw an aliquot appropriate for your application. To minimize uncertainty contribution from this dilution step, use Class A pipets and a minimum sample size of 50 uL.

Traceability Information

Analyte Source Materials: The highest purity analyte source materials are used in the manufacture of this RM. The actual purity is referenced above. Analyte source material purity and associated uncertainty has been analytically verified.



ISO 9001:2008 UL Registered Firm - Certificate # 10002343 QM08

Page 1 of 2



ANEXO 4: Detalles de columnas, fases estacionarias y detectores más comunes en GC

I. Columnas Cromatográficas y fases estacionarias

La columna constituye la parte esencial del sistema cromatográfico y de la que depende el éxito o el fracaso de los análisis. En ella está contenida la fase estacionaria, que determina la selectividad y la eficacia de las separaciones.

Existen dos tipos de columnas, columnas empacadas o de relleno y las columnas tubulares abiertas o capilares; anteriormente, la mayor parte de las cromatografías de gases se realizaban con columnas empacadas, mientras que actualmente se utilizan más extensamente las columnas capilares, estas suelen ser de acero inoxidable o vidrio para las columnas empacadas, y sílice para las capilares, si bien se han utilizado también otros metales como aluminio o cobre, e incluso teflón [20].

I.1 Columnas Empacadas

Las columnas empacadas suelen ser tubos de vidrio o de acero inoxidable con una longitud comprendida entre 1 y 6 metros, con un diámetro interno que oscila entre 2 y 6mm, y que se llenan con un soporte sólido de grano fino (60-100 mallas, 0.25-0.15 mm) recubierto de una capa delgada (0.05-1 μ m) de un líquido no volátil que actúa de fase estacionaria. Una buena columna empacada puede contener entre 1000 y 2000 platos teóricos por metro, mientras que las columnas capilares pueden llegar hasta los 10000 platos por metro [19].

El soporte sólido deberá presentar las siguientes características:

- Presentar una superficie relativamente grande, para que la película de la fase estacionaria pueda distribuirse de manera uniforme y ofrecer un máximo contacto con la fase móvil y así facilitar el proceso de intercambio entre ambas fases.
- Debe ser relativamente duro, para que las partículas no se rompan durante el proceso de impregnación con la fase estacionaria y el llenado de la columna.
- Ser térmicamente estable y poroso, para no producir una caída de presión excesiva.
- Ser químicamente inerte y no debe provocar fenómenos de adsorción que puedan influir en la separación cromatográfica.

Aunque se han estudiado muchos materiales, ninguno cumple rigurosamente todas las condiciones enumeradas previamente. De todos ellos, el más frecuentemente utilizado se prepara partir de tierra de diatomeas (Chromosorb, Gas Chrom, etc.). Dentro de los cuales tenemos:

- **ChromosorbP.** Soporte de color rosa, constituido por granos muy duros, de área superficial elevada (4.0 m²/g) y que puede soportar gran cantidad de fase estacionaria (35% w/w). Presenta una marcada interacción con los solutos, particularmente a temperatura elevada.
- **ChromosorbW.** Soporte silíceo de color blanco, obtenido por tratamiento a 1600 °C con un fundente alcalino. Presenta menor área superficial (1.0 m²/g) que el ChromosorbP y puede impregnarse, como máximo, con un 15 % de fase líquida.
- **ChromosorbG.** Es el más duro de todos y doblemente denso que el ChromosorbW, presentando relativamente poca interacción con compuestos polares. Debido a su pequeña superficie, tiene poca capacidad de retención de fase líquida.

Un problema importante que presentan los soportes sólidos diatomáceos es la marcada actividad superficial que presentan. Esta se debe, sobre todo, a la presencia de los grupos silanol (Si-OH) que se forman sobre la superficie de los silicatos, debido a la humedad, los cuales constituyen puntos activos que provocan adsorción de compuestos polares; por lo cual se somete a diversos tratamientos químicos (lavados ácidos o básicos, silanización de grupos silanol libres, ligado de pequeñas cantidades de fases estacionarias, etc.), con el fin de eliminar, en la mayor medida posible, los puntos activos de la superficie del soporte que pudiesen interaccionar con los compuestos a separar.

Estas columnas ofrecen menos eficacia y menos resolución que los capilares.

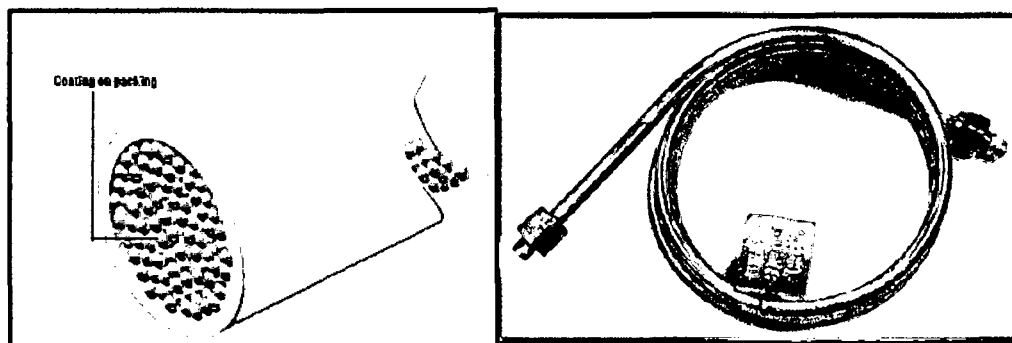


Figura VII.1 Columnas empacadas para cromatografía de gases. [19]

I.2 Columnas Capilares

Las columnas capilares fueron descritas inicialmente por Golay en 1957, y es ampliamente usado, debido a la gran eficacia de separación, el cual permite la separación de mezclas muy complejas. Una columna capilar es un tubo que está hecho de sílice fundida y recubierta de poliimida, donde la superficie interna está recubierta por la fase estacionaria. Las columnas capilares tienen longitudes entre 10 y 100 metros, cuyo diámetro interno está comprendido entre 0.1 y 0.6mm. Los dos tipos más importantes de columnas capilares son las de **pared recubierta (WCOT)** y con **soporte recubierto (SCOT)**, existiendo una tercera modalidad denominada de **capa porosa (PLOT)** (ver figura VII.2) [8].

- a) **Columna abierta de pared recubierta (WCOT):** Son tubos capilares (que son las de uso más frecuente) cuya pared interna está recubierta por una fina capa de fase estacionaria
- b) **Columna abierta con soporte recubierto (SCOT):** En estas columnas, la superficie interna del capilar está revestida de una fina capa (de unos 30 μm) de un material soporte, tal como tierra de diatomeas, el a su vez este soporte está recubierta de una fase líquida estacionaria.
- c) **Las columnas capilares de capa porosa (PLOT):** consisten en columnas de sílice en las que la fase estacionaria está constituida por partículas de un sólido activo sobre su superficie interna. Estas columnas se desarrollaron inicialmente para el análisis de compuestos de bajo peso molecular, tales como gases atmosféricos e hidrocarburos C1 a C6.

Generalmente, la eficacia de una columna SCOT es menor que la de una columna WCOT, pero es sensiblemente mayor que la de una columna empacada. Las principales diferencias entre las columnas WCOT y las columnas empaquetadas son:

- ❖ Las columnas capilares proporcionan mayor resolución que las columnas empacadas. Ello se debe a que la longitud de la columna es mayor, con lo que se aumenta el número de platos teóricos, pudiéndose llegar a los 500000, frente a 10000 de las columnas empaquetadas [52].

- ❖ El tiempo necesario para realizar un análisis (tiempos de retención) con columnas WCOT es menor que con columnas empacadas, como consecuencia del menor contenido de fase estacionaria, con lo que los solutos se retienen menos tiempo.
- ❖ La cantidad de muestra utilizada con columnas capilares suele ser del orden de los nano-gramos, frente a los microgramos que se usan frecuentemente en las columnas empacadas [21].
- ❖ Aunque en las columnas capilares se utiliza una cantidad de muestra considerablemente menor que en las columnas empaquetadas, el límite de detección es del mismo orden de magnitud, debido a que con aquellas tiene lugar un menor ensanchamiento de las bandas, originándose picos estrechos bien definidos.

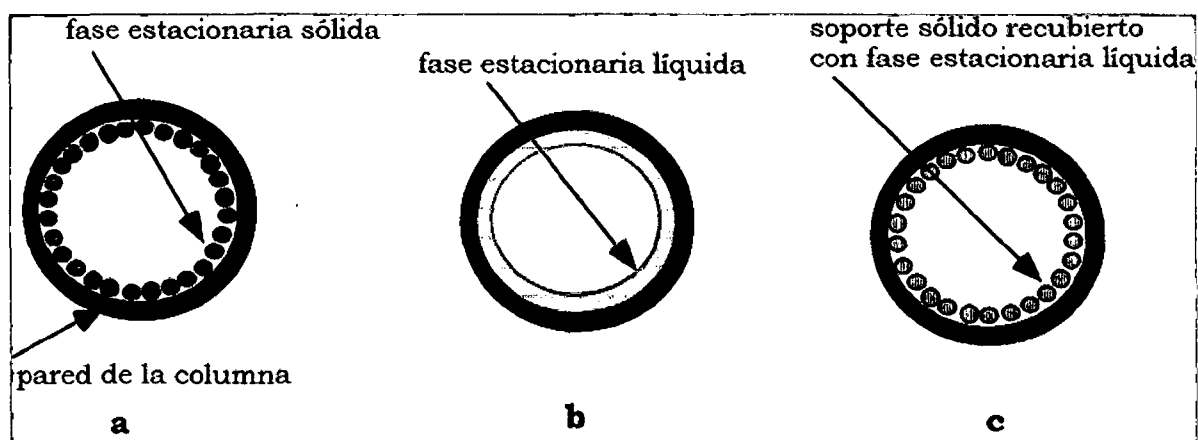


Figura VII.2 Columnas tubulares abiertas. a) de capa porosa (PLOT). b) con pared recubierta (WCOT). c) con soporte recubierto (SCOT) [20].

L3 Fase Estacionaria

La fase estacionaria para cromatografía gas-líquido deberá reunir las siguientes características:

- Baja volatilidad a la temperatura de la columna. Se sugiere que su punto de ebullición sea, al menos, 100 °C mayor que la máxima temperatura de trabajo.
- Estabilidad térmica a la temperatura de la columna.
- Inercia química, no deberá reaccionar químicamente con los componentes de la muestra.

Las fases estacionarias polares contienen grupos como -CN, -CO y -OH, como por ejemplo las fases poliésteres. Las fases no polares son del tipo hidrocarbonado y dialquilsiloxanos. Generalmente la polaridad de la fase estacionaria debe ser parecida a la de los componentes de la muestra. Cuando la igualdad es buena, el orden de elución viene determinado por el punto de ebullición de los compuestos a eluir.

El espesor de las fases estacionarias varía entre 0.1 a 5 μm . Las películas gruesas se utilizan con analitos muy volátiles debido a que retienen más a los solutos. Por el contrario las películas delgadas se utilizan para separar especies de baja volatilidad.

El número de fases líquidas empleadas en las separaciones por cromatografía de gases es muy elevado, si bien, puede afirmarse que el 90 % de los análisis pueden llevarse a cabo utilizando un reducido número de ellas. En la tabla VII.1. Se muestran algunas de más utilizadas, situadas en orden creciente de polaridad.

Tabla VII.2: Algunas fases estacionarias comunes en cromatografía gas-líquido.

Fase estacionaria	Nombre comercial común	Temperatura máxima, °C	Aplicaciones comunes
Polidimetilsiloxano	OV-1, SE-30	350	Fase no polar de uso general; hidrocarburos; aromáticos plurinucleares; drogas; esteroides; PCBs
Poli(fenilmetidifenil) siloxano (10% fenil)	OV-3, SE-52	350	Esteres metílicos de ácidos grasos; alcaloides; drogas; compuestos halogenados
Poli(fenilmetil) siloxano (50% fenil)	OV-17	250	Drogas; esteroides; pesticidas; glicoles
Poli(trifluoropropildimetil) siloxano	OV-210	200	Aromáticos clorados; nitroaromáticos; bencenos alquilsustituídos
Poli(etilén glicol)	Carbowax 20M	250	Ácidos libres; alcoholes; éteres; aceites esenciales; glicoles
Poli(dicianoalildimetil) siloxano	OV-275	240	Ácidos grasos poliinsaturados; ácidos de la colofonia; ácidos libres; alcoholes

La columna cromatográfica como se puede observar en la figura VII.3, consiste en separar la muestra en componentes individuales. Un componente se divide entre la fase gas carrier (helio) y la fase estacionaria de la columna, dependiendo de la relativa atracción por las 2 fases.

- ✦ La atracción puede ser por solubilidad, volatilidad, polaridad, interacciones química específicas o cualquier otra propiedad que diferencie un componente de otro.
- ✦ El componente se mueve a través de la columna a una velocidad menor que la de la fase móvil. La fuerza de su atracción con la fase estacionaria determinará cuanto menos [24].
- ✦ Si diferentes componentes tienen diferentes atracciones serán separados en el tiempo.

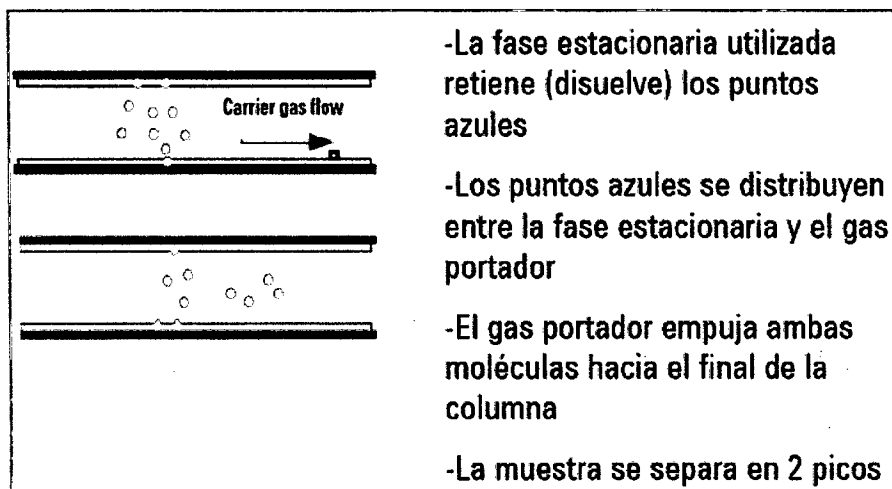


Figura VII.3 Comportamiento del soluto en la fase estacionaria [23].

En las figuras VII.4, veremos el comportamiento de la resolución de la columna (separación) con respecto al diámetro interno y longitud de la columna

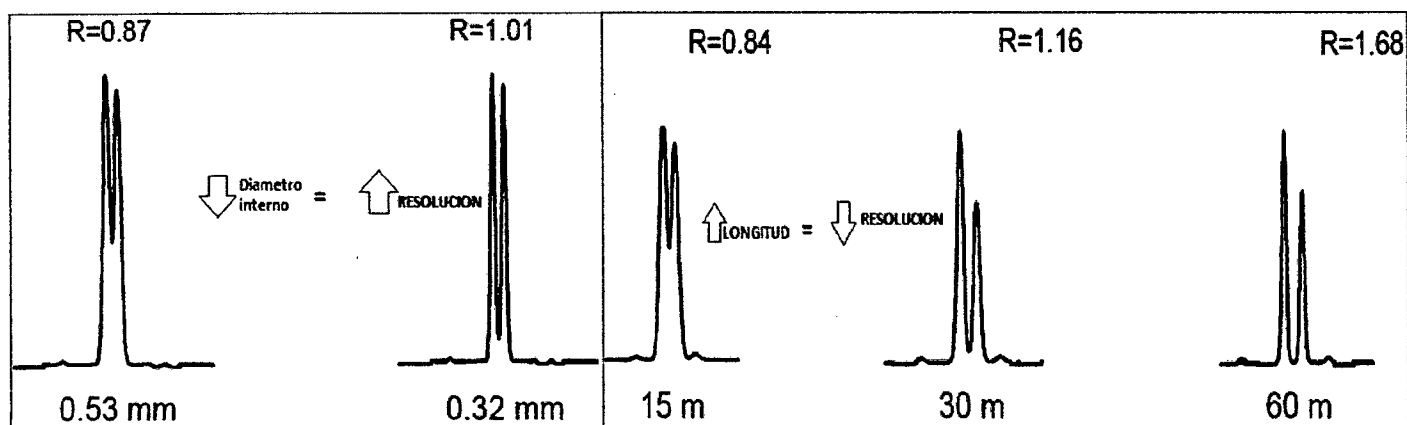


Figura VII.4 Comportamiento de la Resolución con respecto al diámetro interno y longitud de la columna [8].

I.4 Sistema de Detección

Una vez que los componentes de la muestra han sido separados por la columna, se hace preciso el disponer a la salida de ésta de un sistema de detección, capaz de señalar la elución de un componente de la muestra y ofrecer, al mismo tiempo, una señal proporcional a la cantidad de sustancia que pasa a través de él [26].

I.4.1 Características de un detector

- **Sensibilidad adecuada.** Puede considerarse que la sensibilidad es una medida de la magnitud de la señal originada por el detector para una cantidad o concentración de analito determinada.
- **Buena estabilidad y reproducibilidad.** La línea base de un cromatograma está sometida a fluctuaciones fortuitas, conocidas como "ruido de fondo" (figura VII.5), el cual se puede originar en los distintos componentes del instrumento, como los amplificadores, registradores, etc., así como en fluctuaciones del gas portador. Muchos de estos ruidos pueden eliminarse utilizando componentes de alta calidad y operando adecuadamente con el cromatógrafo, si bien, siempre existirá un ruido inherente al detector, el cual, junto con la sensibilidad, establece el límite de detección de un determinado soluto. En cromatografía, el límite de detección suele considerarse como la mínima cantidad de muestra para la cual el detector

proporciona una señal, S , de, al menos, el doble del nivel de ruido (ver figura VII.5).

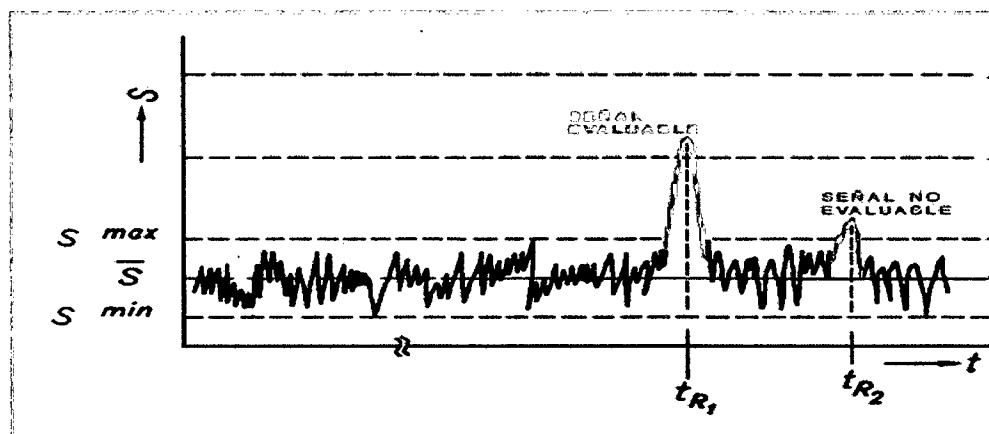


Figura VII.5 Parámetros de la relación señal/ruido de dos bandas cromatográficas [19].

- **Tiempo de respuesta.** El detector debe responder con rapidez a los cambios de concentración del analito, si bien en el tiempo total de respuesta del cromatógrafo influyen también la inercia de otros componentes, como el registrador [52].
- **Versatilidad.** El detector deberá responder a una gran variedad de analitos y, a ser posible, proporcionar una respuesta semejante para todos ellos.

Los detectores más utilizados en cromatografía de gases, y de los que se indicarán seguidamente sus principales características, son el de conductividad térmica (TDC), el de ionización de llama (FID) y el de captura electrónica (ECD).

Para la determinación de los Hidrocarburos Aromáticos policíclicos se usó como detector el espectrómetro de masas.

A) Detector de Conductividad Térmica (TCD)

Se basa en los cambios de conductividad térmica de la corriente de gas ocasionados por la presencia del analito. Consiste en un filamento metálico o un "termistor*" que al calentarlo, en condiciones de estado estacionario, adquiere una temperatura por la conductividad térmica del gas que se encuentra en sus proximidades. Cuando cambia la composición del

gas, cambia la temperatura del elemento (filamento o termistor) y esto se refleja mediante un cambio en su resistencia eléctrica [8].

El detector de conductividad térmica es universal y no es destructivo; por lo general se utiliza para el análisis de gases permanentes, hidrocarburos ligeros y otros tipos de compuestos que ofrecen una respuesta pobre en otros tipos de detectores. La conductividad térmica del H₂ y He es mucho mayor que la de moléculas orgánicas. Por lo tanto la presencia de moléculas orgánicas causa un aumento de T en el filamento, modificando su resistencia.

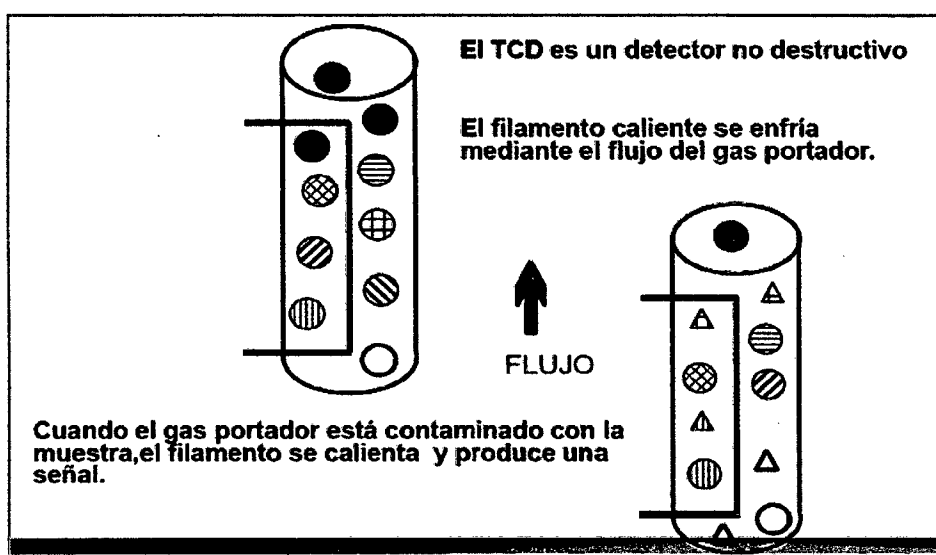


Figura VII.6 Detector de Conductividad térmica (TCD).

B) Detector de Ionización de Llama (FID)

El FID consiste de una flama hidrógeno/aire y una placa colectora. Las muestras que salen de la columna pasan a través de la flama, la cual rompe las moléculas orgánicas y produce iones. Los iones son colectados en un electrodo parcial y produce una señal eléctrica. Es extremadamente sensible en un amplio rango dinámico. La única desventaja es que destruye la muestra.

La Corriente es proporcional al número de iones que se producen que es proporcional al número de átomos de C reducidos en la flama y es selectivo para sustancias que contienen

uniones C-H en su estructura química. El detector de ionización de llama es uno de los más utilizados actualmente. Responde a casi todos los compuestos orgánicos, mientras que es insensible a gases no combustibles como CO₂, SO₂, óxidos de nitrógeno. Su sensibilidad es más elevada que la del TCD ($\cong 10-12$ g/mL) [19].

Los detectores de ionización de llama ofrecen una elevada sensibilidad, gran estabilidad y un rango dinámico lineal excepcionalmente elevado; todo ello, junto con una gran sencillez de utilización ha hecho que este tipo de detectores, como ya se ha mencionado, sean con mucho los de mayor utilización.

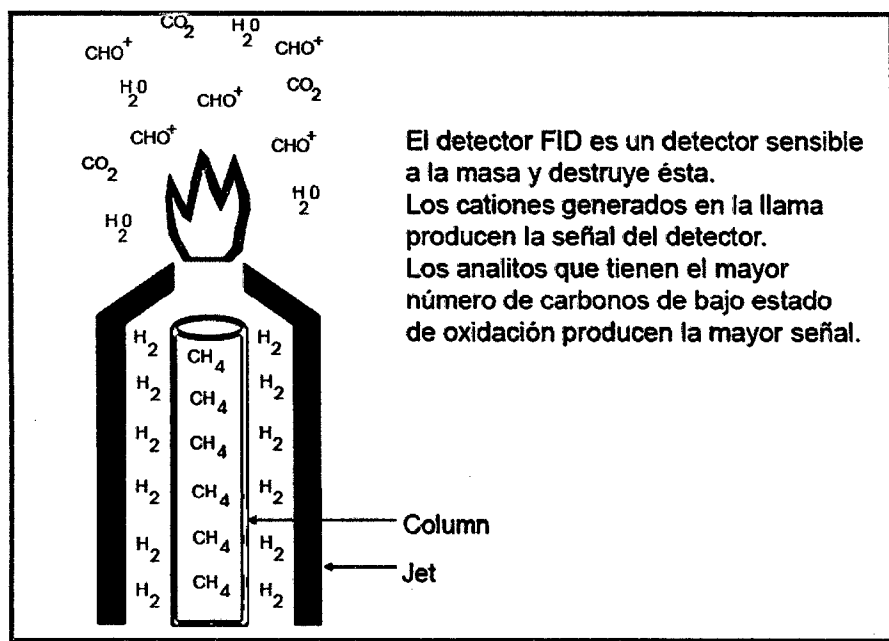


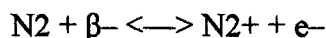
Figura VII.7 Detector de ionización de llama (FID) [20].

C) Detector de Captura de Electrones (ECD)

El detector de captura electrónica ocupa probablemente el segundo lugar entre los detectores de más alta utilización, debiéndose este hecho a su excepcional sensibilidad (el detector de captura electrónica es probablemente el dispositivo analítico más sensible que se conoce) [19].

En el detector de captura electrónica se mide una pérdida de señal cuando el analito se eluye de la columna cromatográfica. En la figura VII.8. Se representa un esquema del ECD, que opera de la forma siguiente: el gas portador, N₂, se hace pasar a través de una cámara que contiene un emisor de partículas β (Ni-63 o tritio adsorbido sobre una lámina de

platino) de alta energía, las cuales, al interactuar con dicho gas portador producen grandes cantidades de electrones térmicos que se dirigen hacia un electrodo colector (por aplicación de un voltaje entre 1 y 100 V), originándose una corriente uniforme o corriente-base.



Cuando moléculas del analito con alta afinidad electrónica entran al detector, capturan algunos electrones según el proceso,



Con lo que se produce una disminución de la corriente. Esta señal se procesa electrónicamente para formar el cromatograma.

El detector de captura electrónica, responde de forma muy selectiva frente a compuestos que presenten grupos con elevada afinidad electrónica, en particular halógenos y grupos nitro, ofreciendo frente a este tipo de compuestos una respuesta 10⁶-10⁷ veces superior a la que muestra frente a los hidrocarburos.

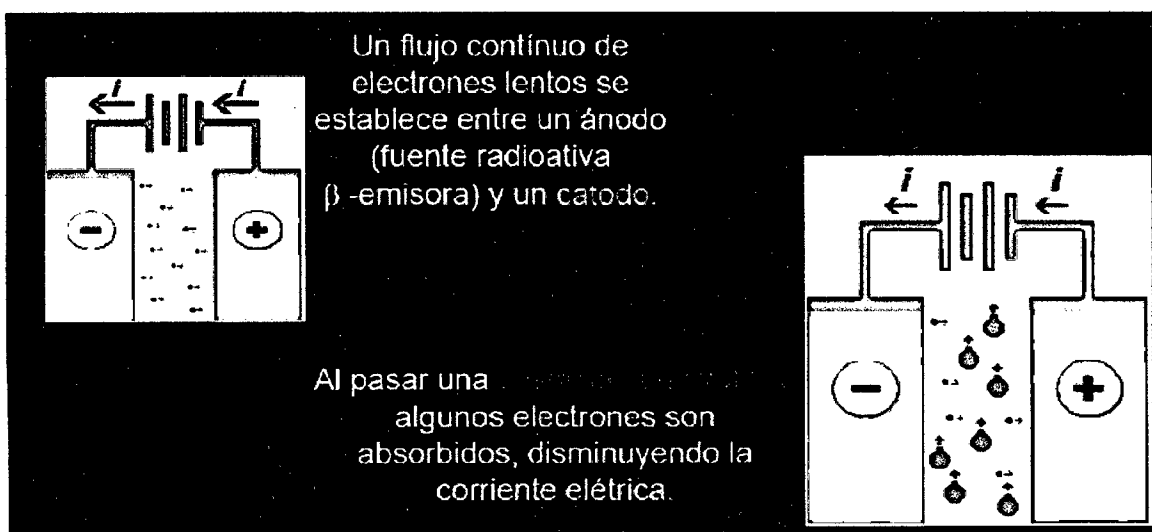


Figura VII.8 Esquema del Detector de captura de electrones (ECD)

D) Espectrómetro de Masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica muy potente utilizada para:

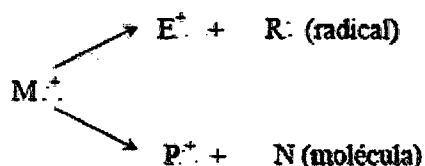
- ✓ Identificar compuestos desconocidos.
- ✓ Cuantificar compuestos conocidos.
- ✓ Elucidar la estructura química de las moléculas.

La espectrometría de masas (EM) es una técnica de análisis basada sobre la separación de acuerdo a sus razones masa/carga de las especies cargadas formadas a partir de la ionización de una muestra. Se trata de una técnica extremadamente sensible, de gran versatilidad y cuyos campos de aplicación experimentan un crecimiento vertiginoso en nuestros días. La EM suministra información muy valiosa sobre los compuestos químicos: la masa molecular, la fórmula global y, a partir del patrón de fragmentaciones, la estructura molecular, así como la composición isotópica en sustancias naturales o marcadas.

Los fundamentos de la espectrometría de masas pueden ejemplifican mediante la técnica de ionización electrónica. Electrones acelerados a través de un campo eléctrico adquieren energía cinética considerable y pueden interactuar con moléculas (M) para originar especies cargadas:



En este caso M^+ es un catión-radical molecular. Normalmente M^+ se forma en un estado excitado y puede sufrir fragmentación, que puede ser de diferentes formas:



Los iones E^+ y P^+ a su vez pueden fragmentarse y así sucesivamente. La forma de fragmentación dependerá en cada caso de la estructura molecular. La mayoría de los iones producidos tiene una carga correspondiente a la pérdida de un solo electrón ($e = 1.6 \cdot 10^{-19}$ C), aunque también se pueden obtener iones multicargados. La carga total de los iones se representa usualmente por q ($q=ze$), donde e es la carga del electrón y z el número de cargas sobre el ión. Todos los iones producidos son separados en un espectrómetro de masas de acuerdo con su razón masa/carga. Los iones así separados son detectados como

corrientes iónicas cuyas intensidades son proporcionales a sus abundancias respectivas. Procesando esta información se obtiene un espectro de masas (EM), tal como se muestra en la Figura VII.9.

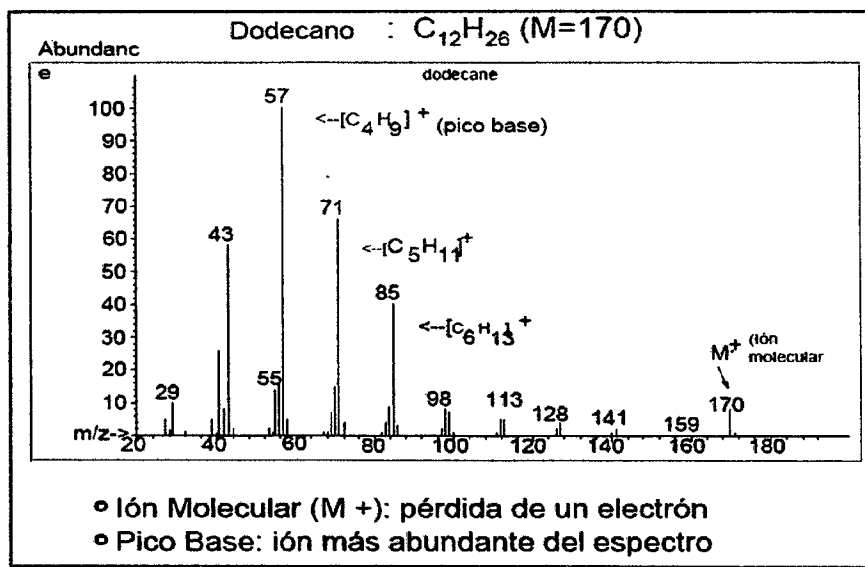


Figura VII.9 Espectro de masas del dodecano.

El pico más intenso en el EM se denomina pico base y en los gráficos de líneas, como el mostrado en la figura VII.9, se utiliza como intensidad de referencia para el resto de los picos significativos.

De acuerdo con lo descrito hasta el momento, un espectro de masas puede ser representado por un gráfico en el cual el eje (x) corresponde a la razón m/z de cada ión y el eje (y) a la abundancia o intensidad relativa correspondiente a cada valor de m/z .

Para obtener un espectro de masas es necesario:

- Un **sistema de introducción de muestra**, que puede ser entre otros un cromatógrafo de líquidos o un cromatógrafo de gases.
- Una **fuentes de ionización**, que es donde se produce la fragmentación molecular característica de cada compuesto,
- Un **analizador** o filtro de masas que separa los fragmentos iónicos generados en función de su relación masa/carga
- Un **detector** que recoge y caracteriza los fragmentos iónicos que salen del analizador.

En la Figura VII.10 se muestra esquemáticamente un espectrómetro de masas, en este caso con ionización electrónica y analizador cuadrupolo.

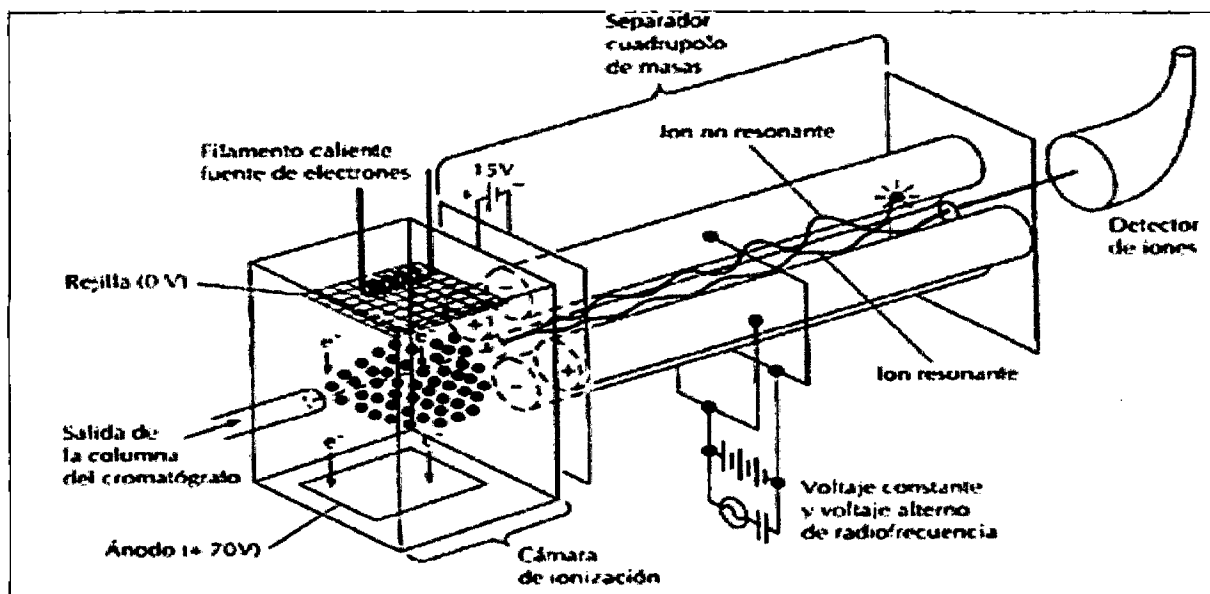


Figura VII.10 Esquema de un espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo.

Como se puede apreciar, la relación de los aspectos necesarios para obtener un espectro de masas de hecho incluye los componentes básicos de un espectrómetro de masas.

Todos los espectrómetros de masas tienen que funcionar en condiciones de alto vacío. Esto es necesario para lograr que los iones puedan llegar al detector sin interactuar con otras moléculas gaseosas. Esas interacciones unidas a las que pueden ocurrir con las paredes del instrumento provocan que los iones pierdan su carga. Por otro lado, las interacciones ión-molécula pueden producir reacciones no deseadas e incrementar la complejidad de los espectros. Reducir el número de interacciones es tan importante que resulta necesario utilizar sistemas de bombas de vacío muy eficientes, que incluyen bombas mecánicas en unión de bombas turbomoleculares, de difusión o criogénicas.

A. Sistema de introducción de muestra: En el espectrómetro de masas dependerá de las propiedades físico-químicas de los compuestos a detectar. El acoplamiento de la cromatografía gaseosa (GC) como sistema de introducción de muestra, incrementa la capacidad de identificación de la técnica, proporcionando una herramienta de identificación y confirmación única.

B. Fuente de Ionización: Es el lugar del espectrómetro de masas en el que se introduce la muestra y en el que se produce la ionización. Cuando el sistema de introducción de muestra es un acoplamiento GC, la muestra se encuentra en estado vaporizado y la única función de la fuente de ionización es ionizar las moléculas neutras (conferirles carga) por aplicación de una determinada energía. En este tipo de acoplamientos la ionización se produce en estado de vacío.

B.1. Ionización Electrónica: La fuente de ionización electrónica (Electron Ionization: EI) fue la técnica inicialmente más utilizada en espectrometría de masas y su descripción permite comprender los aspectos esenciales de este método.

Las moléculas pueden interactuar con los electrones para dar iones, los cuales son micropartículas cargadas eléctricamente. La interacción molécula-electrón suele denominarse erróneamente impacto electrónico, aunque no es realmente una colisión en el sentido de la Física Clásica.

La fuente de EI, cuyo esquema se muestra en la Figura VII.11, consiste en un filamento cargado negativamente y calentado por una corriente que circula en el mismo que actúa como emisor de electrones.

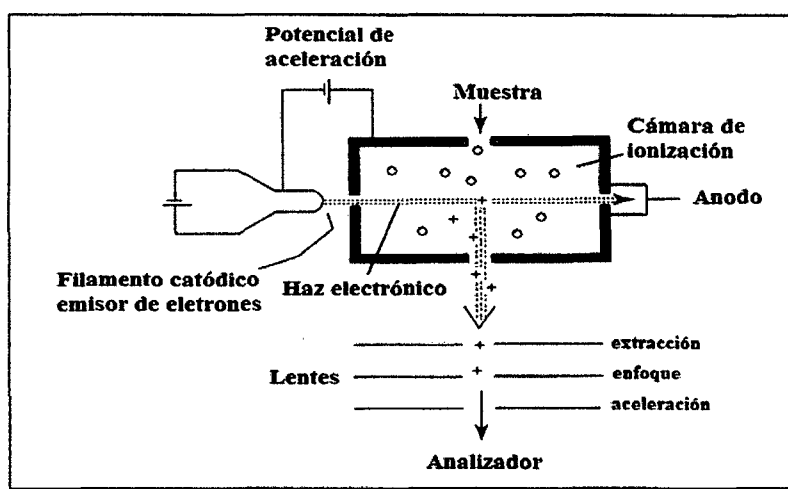


Figura VII.11 Fuente de Ionización Electrónica (EI)

Los electrones son acelerados hacia un ánodo e interactúan con las moléculas gaseosas de la muestra inyectada en la fuente o procedente del sistema de introducción.

B.2. Ionización química: La ionización química (Chemical Ionization: CI) es una técnica blanda que produce iones con pequeña energía en exceso. La fuente de CI es muy similar a la de EI, en muchos instrumentos el cambio de fuente es expedito. En la fuente CI el flujo de electrones crea un plasma de gas reactivo ionizado (por ejemplo: metano, isobutano, amoníaco, agua) que se encuentra a mucha mayor concentración que la muestra (presión parcial 60 Pa, relación gas reactivo/muestra 1000:1). La ionización se origina entonces por la interacción entre las moléculas de la muestra y el gas, y no por la interacción directa de aquellas con el flujo electrónico.

La ionización química (CI) es mucho más suave que la ionización por impacto electrónico (EI), por lo que se produce menos fragmentación. El gas reactivo más común es el metano, que produce iones prácticamente con cualquier molécula de muestra, otros gases reactivos (isobutano, amoníaco) son más selectivos y producen incluso menos fragmentación.

La ionización química (CI), es el método más frecuentemente utilizado para determinar pesos moleculares de compuestos.

C. Analizadores

Luego de que los iones se han producido en la fuente de ionización, deben ser separados y enfocados hacia el detector de acuerdo con el valor de la razón masa/ carga de cada uno. Esto se logra mediante los analizadores, que constituyen la óptica iónica de un espectrómetro de masas. Esta óptica iónica es frecuentemente un sistema de campos eléctricos y magnéticos mediante el cual un flujo de iones puede ser separado en sus componentes de acuerdo con sus valores de m/z y enfocado hacia el detector. Al sistema de campos eléctricos y magnéticos se le denomina lentes por analogía con su contraparte óptica.

Las tres características principales de un analizador son el límite de masas superior o alcance de masas, la transmisión y la resolución. El límite de masas es el valor más alto de la razón m/z que puede ser medido y se expresa en thomson (Th) o unidades atómicas (u) para un ión portador de una carga elemental, esto es $z = 1$. La transmisión es la razón entre el número de iones que llega al detector y el número de iones producido en la fuente.

Los tipos de analizadores más utilizados son:

C.1 Analizador Cuadrupolar: está formado por cuatro barras conductoras de sección hiperbólica alineadas paralelamente entre sí y equidistantes de un eje central imaginario situado sobre el eje Z, donde los segmentos opuestos están conectados y los segmentos adyacentes están eléctricamente aislados. Se aplica una combinación de corriente continua (DC) y voltajes de radiofrecuencia (RF) sobre los pares de segmentos. La magnitud del voltaje de radiofrecuencia determina la relación masa/carga que es capaz de describir una trayectoria tal que atraviesa el analizador y alcanza el detector. De modo que variando dicha magnitud se podrán detectar los fragmentos iónicos cargados positivamente que se generaron en la fuente de ionización y que son característicos de cada compuesto.

Este tipo de analizador es robusto y muy reproducible. Es muy utilizado en el modo SIM (Selected Ion Monitoring) en el que solo filtra los iones de unas relaciones m/z concretas. Esto permite obtener espectros de masas muy simples (con muy pocos iones) pero que son muy sensibles. Además la respuesta lineal a la concentración es muy buena, por lo que son muy utilizados para llevar a cabo análisis de cuantificación.

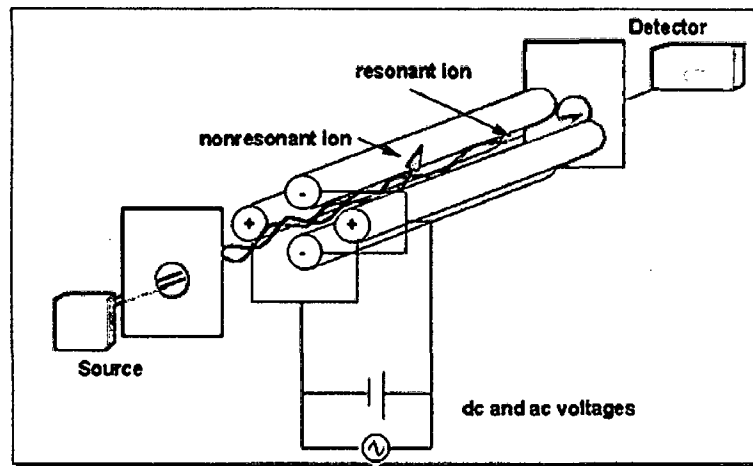


Figura VII.12 Esquema de un Analizador Cuadrupolar.

C.2. Analizador de Sector Magnético: Opera según el principio de la dispersión del haz de iones cuando se le somete a un campo magnético intenso. Son equipos voluminosos y que requieren un alto vacío ($10E^{-7}$ torr). Para iones de una sola carga y considerando un campo magnético y un voltaje de aceleración constantes, la masa es directamente proporcional al radio del arco descrito por los iones, de modo que éstos se pueden separar en función de su masa. Variando el campo magnético aplicado se van seleccionando todos

los fragmentos iónicos generados. Además el campo magnético produce un enfoque direccional del haz de iones. Los campos electrostáticos permiten corregir la dispersión del haz de iones que conduce a una pérdida de resolución.

La característica principal de este tipo de analizadores es que permiten trabajar a alta resolución (diferenciar relaciones m/z que solo difieren a partir del cuarto decimal) con gran sensibilidad.

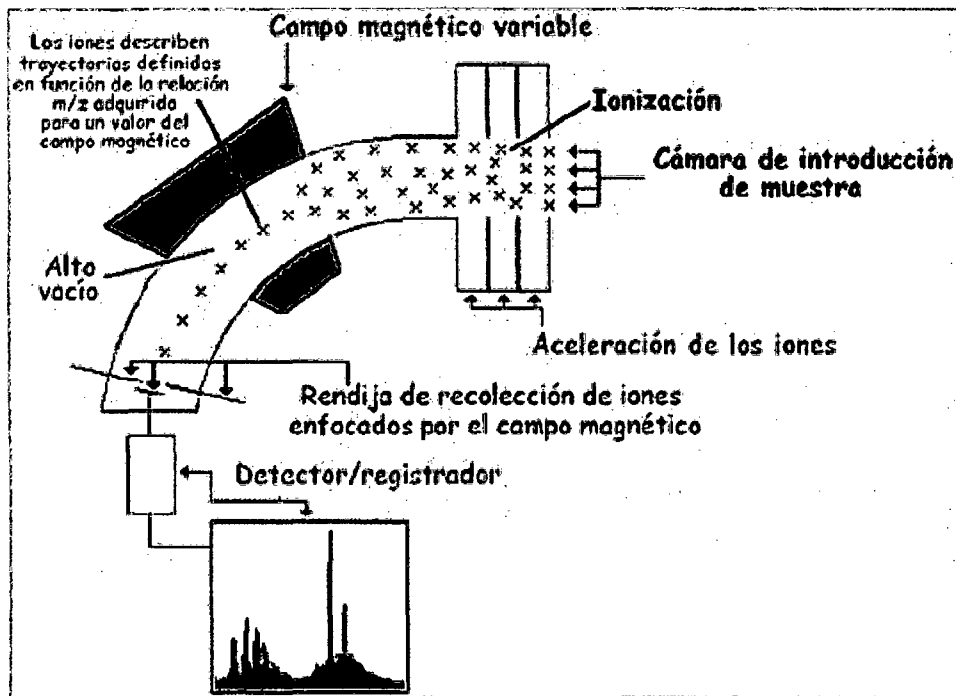


Figura VII.13 Esquema de analizador de sector magnético.

Anexos VIII

Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH's)

IV.1 Características y clasificación.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) han estado presentes en el medioambiente desde los inicios de la vida del hombre, ya que son compuestos naturales. Sin embargo, el crecimiento industrial ha supuesto un aumento de gran número de contaminantes en el entorno natural, entre ellos los PAH's. El estudio científico de los PAH's y sus efectos comenzó en 1775, al atribuirse el cáncer padecido por los limpiadores de chimeneas a la exposición al hollín y la ceniza que suponía su actividad. Investigaciones posteriores sugirieron que los agentes causantes del cáncer eran los PAH's contenidos en el hollín. A lo largo de los años 30 se demostró que algunos de los PAH's presentaban un fuerte potencial cancerígeno, mientras se iniciaba el estudio de propiedades similares en otros. [11]

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH's) constituyen una familia de mas de 100 compuestos orgánicos diferentes formados por dos o más anillos bencénicos y en algunos casos un anillo pentagonal, con o sin sustituyentes sobre sus átomos de carbono e hidrogeno [54]. La abundancia de estos compuestos en el medio ambiente, unido a su carcinogenicidad, los ha situado en las listas de polucionantes orgánicos prioritarios.

Los PAH's pertenecen al grupo de Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) ya que, de acuerdo con el protocolo de Contaminantes Orgánicos Persistentes firmado el 24 de junio de 1998 en Dinamarca, reúnen las cinco características fundamentales: (i) ser tóxicos, (ii) persistentes, (iii) bioacumulables, (iv) ser transportados a través del aire y depositados a largas distancias, y (v) causar efectos negativos sobre la salud y el medioambiente tanto cerca, como lejos de su fuente emisora [28]. Esta diferencia de persistencia de los distintos compuestos es la que va a decidir sobre la mayor o menor capacidad de bioacumulación de cada uno de ellos. Como regla general, la persistencia del compuesto aumenta al aumentar el tamaño de la molécula. Por ejemplo, la relativa baja persistencia del naftaleno y de otros compuestos de peso molecular bajo indica su escasa capacidad de bioacumulación. Por otro

lado, los compuestos de mayor peso molecular (benzo(a) pireno) son altamente persistentes y por tanto bioacumulables.

Los PAH's son sustancias lipofílicas, tendencia que se incrementa con el aumento de su masa molecular (decrece la solubilidad con el agua) , e inestables fotoquímicamente, por lo que se degradan con la luz (proceso de fotooxidación) [25]. Bajo la influencia de la luz del sol o de una fuente artificial de luz UV, y en presencia de oxígeno, ozono u otros oxidantes, los PAH's reaccionan a peróxidos intracíclicos. Debido al carácter lipofílico son potencialmente bioacumulados y concentrados en sedimentos y suelos tanto más, cuanto mayor sea su persistencia en cada medio

La fluorescencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos está relacionada con la presencia de orbitales π -enlazantes de alta energía y deorbitales π^* -antienlazantes de energía inferior. La transición electrónica entre ambos tipos de orbitales es la que origina el color y espectros característicos de absorción UV y de fluorescencia.

La solubilidad de estos compuestos es un parámetro que determinará en gran manera la concentración y el tipo de PAH's que podemos encontrar en el medio ambiente acuoso. Aunque la solubilidad de los PAH's en agua es muy baja, por ejemplo $2.6 \cdot 10^{-4}$ mg/L para el dibenzo(a, h) antraceno, o $5 \cdot 10^{-4}$ mg/L para el benzo(a) pireno, estos compuestos pueden aumentar su solubilidad en presencia de detergentes, sales alcalinas, ácidos grasos o disolventes orgánicos. También tiene una influencia considerable en la solubilidad de estas sustancias, la presencia de grupos alquílicos en sus moléculas, así como la configuración geométrica de las mismas. Otro factor importante a tener en cuenta es la temperatura, pudiéndose triplicar la solubilidad de algunos PAH's al variar la temperatura entre 6 y 26 °C. Por otra parte, los PAH's son capaces de asociarse con los coloides presentes en el medio y, de esta forma, pueden ser transportados a través del mismo. De esta forma, se justifica la presencia de PAH's en organismos que habitan en lugares alejados de una intensa actividad humana o el hecho de que los sedimentos sean más ricos en PAH's que el medio que los rodea.

La Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos ha seleccionado 16 PAH's como contaminantes cuyo estudio debe considerarse prioritario. En la Tabla VIII.1 se recogen dichos hidrocarburos, junto con sus estructuras, constantes fisicoquímicas y potencia cancerígena estimada. Entre ellos, destacan por sus características cancerígenas el Benzo(a)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Benzo(a)antraceno, Benzo(k)fluoranteno, Criseno y Benzo(ghi)perileno.

El papel de los PAH's, como inductores del conjunto de anormalidades celulares conocidas como "cáncer", ha atraído el interés y la actividad de los investigadores, habiéndose estudiado, cómo la estructura de los PAH's es crítica para las propiedades cancerígenas y teratogénicas de los mismos. Los PAH's no son, aparentemente, cancerígenos reales en sí mismos, pero son metabólicamente convertidos en cancerígenos activos en el interior del organismo receptor. Dado que muchos compuestos orgánicos cancerígenos son electrofilicos, una teoría ampliamente apoyada es que estas sustancias reaccionan con un átomo de nitrógeno del ADN, modificando el mensaje genético transmitido durante la formación de nuevas células.

Los PAH's pueden proceder de la combustión incompleta de la materia orgánica, reciente o fósil, ya sea esta combustión debida a causas naturales o antropogénicas. Como consecuencia de las elevadas temperaturas se generan radicales libres que reaccionen entre sí, formando compuestos con estructuras cíclicas condensadas. La contribución de las fuentes naturales, como los incendios forestales espontáneos y la actividad volcánica [Harvey, 1997], es mínima comparada con las emisiones causadas por el ser humano. Así, son fuentes principales de PAH's, el tráfico intenso de vehículos, las calefacciones domesticas o las plantas industriales que dependen de la combustión de derivados del petróleo y del carbón. Aunque su repercusión ambiental es casi insignificante, el hombre también genera cantidades importantes de PAH's en diferentes actividades sociales, entre los que se encuentran el humo de tabaco, y procesos tecnológicos de los alimentos: ahumados, a la parrilla y los sometidos a tratamientos térmicos severos. En general, la tasa de formación de estos compuestos en los alimentos, depende del tipo de combustible y de las condiciones de combustión (temperatura, accesibilidad de oxígeno, presencia o ausencia de llama, etc.).

Tabla VIII.1 Los 16 PAH's seleccionados por la Agencia Federal para la Protección del Medio Ambiente (EPA) de los Estados Unidos.

PAH's	Solubilidad en agua (mg/L)	Potencial cancerígeno IARC US/US EPA
1. Naftaleno	32	-
2. Acenaftileno	393	-
3. Acenafteno	3.4 a 25°C	
4. Fluoreno	19	
5. Fenantreno	1-1.3 a 25°C	3
6. Antraceno	0.05-0.07 a 25°C	3
7. Fluoranteno	0.26 a 25°C	3
8. Pireno	0.11 a 25°C	3
9. Benzo(a)antraceno	0.01 a 25°C	2A/B2
10. Criseno	-----	3/B2
11. Benzo(b)fluoranteno	-----	2B/B2
12. Benzo(k)fluoranteno	0.0038 a 25°C	2B
13. Benzo(a)pireno	0.0005 a 25°C	2A/B2
14. Dibenzo(a,h)antraceno	0.00026 a 25°C	2A/B2
15. Benzo(g,h)perileno		3
16. Indeno(1,2,3)pireno	-----	2B/B2

2A: probablemente cancerígeno en humanos. 2B posiblemente cancerígenos en humanos.

3. no calificable como cancerígeno en humanos.

--- .No experimentado en humanos.

IARC: Agencia Internacional en la Investigación del Cáncer.

IV.2 Contaminación medioambiental por los PAH's

Los PAH's son un importante grupo de contaminantes orgánicos muy extendidos en el medio ambiente, donde pueden alcanzar importantes concentraciones. La mayoría de los PAH's presentes en el medio ambiente provienen de fuentes antropogénica, mientras que son pocos los originados a partir de fuentes naturales.

Estos compuestos se han hallado en el aire de las grandes ciudades en elevadas concentraciones debido a la intensidad del tráfico o la existencia de fuentes directas de combustión, pero también se encuentran en las aguas, los sedimentos y los lagos de alta montaña. Gracias a su relativa volatilidad o a su capacidad de adsorción a las partículas atmosféricas, los PAH's se transportan continuamente a través del aire, pudiendo ser depositados en lugares remotos a gran distancia de la fuente emisora, ampliando así la dimensión de un problema local o regional a una escala planetaria.

La contaminación mundial por PAH's se ha debido principalmente a la producción industrial a gran escala en el hemisferio norte desde la Revolución Industrial. Las concentraciones han aumentado desde este momento hasta los años 1960-1980. A partir de aquí la disminución de las deposiciones se relaciona con la sustitución del carbón como fuente de energía de centrales hidroeléctricas por gas natural o por energía nuclear, la disminución de la industria pesada, y la regulación de la contaminación del aire.

Como consecuencia de la gran variedad de procesos que producen los PAH's, estos se encuentran en pequeñas concentraciones en todos los sedimentos y suelos del planeta. El estudio de los cambios de sus niveles en zonas remotas permite conocer si la influencia antropogénica ha dado lugar a incrementos significativos de su nivel de fondo y, por tanto, da una idea bastante exacta de la exposición general a la que se encuentran todos los organismos vivos.

ANEXO IX

METHOD 3510C

SEPARATORY FUNNEL LIQUID-LIQUID EXTRACTION

1.0 SCOPE AND APPLICATION

1.1 This method describes a procedure for isolating organic compounds from aqueous samples. The method also describes concentration techniques suitable for preparing the extract for the appropriate determinative methods described in Section 4.3 of Chapter Four.

1.2 This method is applicable to the isolation and concentration of water-insoluble and slightly water-soluble organics in preparation for a variety of chromatographic procedures.

1.3 This method is restricted to use by or under the supervision of trained analysts. Each analyst must demonstrate the ability to generate acceptable results with this method.

2.0 SUMMARY OF METHOD

2.1 A measured volume of sample, usually 1 liter, at a specified pH (see Table 1), is serially extracted with methylene chloride using a separatory funnel.

2.2 The extract is dried, concentrated (if necessary), and, as necessary, exchanged into a solvent compatible with the cleanup or determinative method to be used (see Table 1 for appropriate exchange solvents).

3.0 INTERFERENCES

3.1 Refer to Method 3500.

3.2 The decomposition of some analytes has been demonstrated under basic

extraction conditions. Organochlorine pesticides may dechlorinate, phthalate esters may exchange, and phenols may react to form tannates. These reactions increase with increasing pH, and are decreased by the shorter reaction times available in Method 3510. Method 3510 is preferred over Method 3520 for the analysis of these classes of compounds. However, the recovery of phenols may be optimized by using Method 3520, and performing the initial extraction at the acid pH.

4.0 APPARATUS AND MATERIALS

4.1 Separatory funnel - 2-liter, with polytetrafluoroethylene (PTFE) stopcock.

4.2 Drying column - 20 mm ID Pyrex® chromatographic column with Pyrex® glass wool at bottom and a PTFE stopcock.

NOTE: Fritted glass discs are difficult to decontaminate after highly contaminated extracts have been passed through. Columns without frits may be purchased. Use a small pad of Pyrex® glass wool to retain the adsorbent. Prewash the glass wool pad with 50 mL of acetone followed by 50 mL of elution solvent prior to packing the column with adsorbent.

4.3 Kuderna-Danish (K-D) apparatus.

4.3.1 Concentrator tube - 10-mL, graduated (Kontes K-570050-1025 or equivalent). A ground-glass stopper is used to prevent evaporation of extracts.

4.3.2 Evaporation flask - 500-mL (Kontes K-570001-500 or equivalent). Attach to concentrator tube with springs, clamps, or equivalent.

4.3.3 Snyder column - Three-ball macro (Kontes K-503000-0121 or equivalent).

4.3.4 Snyder column - Two-ball micro (Kontes K-569001-0219 or equivalent).

4.3.5 Springs - 1/2 inch (Kontes K-662750 or equivalent).

NOTE: The following glassware is recommended for the purpose of solvent recovery

during the concentration procedures requiring the use of Kuderna-Danish evaporative concentrators. Incorporation of this apparatus may be required by State or local municipality regulations that govern air emissions of volatile organics. EPA recommends the incorporation of this type of reclamation system as a method to implement an emissions reduction program. Solvent recovery is a means to conform with waste minimization and pollution prevention initiatives.

4.4 Solvent vapor recovery system (Kontes K-545000-1006 or K-547300-0000, Ace Glass 6614-30, or equivalent).

4.5 Boiling chips - Solvent-extracted, approximately 10/40 mesh (silicon carbide or equivalent).

4.6 Water bath - Heated, with concentric ring cover, capable of temperature control (\pm 5EC). The bath should be used in a hood.

4.7 Vials - 2-mL, glass with PTFE-lined screw-caps or crimp tops.

4.8 pH indicator paper - pH range including the desired extraction pH.

4.9 Erlenmeyer flask - 250-mL.

4.10 Syringe - 5-mL.

4.11 Graduated cylinder - 1-liter.

5.0 REAGENTS

5.1 Reagent grade chemicals shall be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended that all reagents shall conform to the specifications of the Committee on Analytical Reagents of the American Chemical Society, where such specifications are available. Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination. Reagents should be stored in glass to prevent the leaching of contaminants from plastic

containers.

5.2 Organic-free reagent water - All references to water in this method refer to organic-free reagent water, as defined in Chapter One.

5.3 Sodium hydroxide solution (10 N), NaOH. Dissolve 40 g NaOH in organic-free reagent water and dilute to 100 mL. Other concentrations of hydroxide solutions may be used to adjust sample pH, provided that the volume added does not appreciably change (e.g., <1%) the total sample volume.

5.4 Sodium sulfate (granular, anhydrous), Na₂SO₄. Purify by heating to 400°C for 4 hours in a shallow tray, or by precleaning the sodium sulfate with methylene chloride. If the sodium sulfate is precleaned with methylene chloride, a method blank must be analyzed, demonstrating that there is no interference from the sodium sulfate. Other concentrations of acid solutions may be used to adjust sample pH, provided that the volume added does not appreciably change (e.g., <1%) the total sample volume.

5.5 Sulfuric acid solution (1:1 v/v), H₂SO₄. Slowly add 50 mL of H₂SO₄ (sp. gr. 1.84) to 50 mL of organic-free reagent water.

5.6 Extraction/exchange solvents - All solvents must be pesticide quality or equivalent.

5.6.1 Methylene chloride, CH₂Cl₂, boiling point 39.6°C.

5.6.2 Hexane, C₆H₁₄, boiling point 68.7°C.

5.6.3 2-Propanol, CH₃CH(OH)CH₃, boiling point 82.3°C.

5.6.4 Cyclohexane, C₆H₁₂, boiling point 80.7°C.

5.6.5 Acetonitrile, CH₃CN, boiling point 81.6°C.

6.0 SAMPLE COLLECTION, PRESERVATION, AND HANDLING

See the introductory material to this chapter, Organic Analytes, Sect. 4.1.

7.0 PROCEDURE

7.1 Using a 1-liter graduated cylinder, measure 1 liter (nominal) of sample. Alternatively, if the entire contents of the sample bottle are to be extracted, mark the level of sample on the outside of the bottle. If high analyte concentrations are anticipated, a smaller sample volume may be taken and diluted to 1-L with organic-free reagent water, or samples may be collected in smaller sample bottles and the whole sample used.

7.2 Pipet 1.0 mL of the surrogate spiking solution into each sample in the graduated cylinder (or sample bottle) and mix well. (See Method 3500 and the determinative method to be used for details on the surrogate standard solution and matrix spiking solution).

7.2.1 For the sample in each batch (see Chapter One) selected for use as a matrix spike sample, add 1.0 mL of the matrix spiking standard.

7.2.2 If Method 3640, Gel-Permeation Cleanup, is to be employed, add twice the volume of the surrogate spiking solution and the matrix spiking standard, since half of the extract is not recovered from the GPC apparatus. (Alternatively, use 1.0 mL of the spiking solutions and concentrate the final extract to half the normal volume, e.g., 0.5 mL instead of 1.0 mL).

7.3 Check the pH of the sample with wide-range pH paper and adjust the pH, if necessary, to the pH indicated in Table 1, using 1:1 (v/v) sulfuric acid or 10 N sodium hydroxide. Lesser strengths of acid or base solution may be employed, provided that they do not result in a significant change (<1%) in the volume of sample extracted (see Secs. 5.3 and 5.5).

7.4 Quantitatively transfer the sample from the graduated cylinder (or sample bottle) to the separatory funnel. Use 60 mL of methylene chloride to rinse the cylinder (or bottle) and transfer this rinse solvent to the separatory funnel. If the sample was transferred directly from the sample bottle, refill the bottle to the mark made in Sec. 7.1 with water and then measure the volume of sample that was in the bottle.

7.5 Seal and shake the separatory funnel vigorously for 1 - 2 minutes with periodic venting to release excess pressure. Alternatively, pour the exchange solvent into the top of the Snyder column while the concentrator remains on the water bath in Sec. 7.11.4.

NOTE: Methylene chloride creates excessive pressure very rapidly; therefore, initial venting should be done immediately after the separatory funnel has been sealed and shaken once. The separatory funnel should be vented into a hood to avoid exposure of the analyst to solvent vapors.

7.6 Allow the organic layer to separate from the water phase for a minimum of 10 minutes. If the emulsion interface between layers is more than one-third the size of the solvent layer, the analyst must employ mechanical techniques to complete the phase separation. The optimum technique depends upon the sample and may include stirring, filtration of the emulsion through glass wool, centrifugation, or other physical methods. Collect the solvent extract in an Erlenmeyer flask. If the emulsion cannot be broken (recovery of < 80% of the methylene chloride, corrected for the water solubility of methylene chloride), transfer the sample, solvent, and emulsion into the extraction chamber of a continuous extractor and proceed as described in Method 3520, Continuous Liquid-Liquid Extraction.

7.7 Repeat the extraction two more times using fresh portions of solvent (Secs. 7.2 through 7.5). Combine the three solvent extracts.

7.8 If further pH adjustment and extraction is required, adjust the pH of the aqueous phase to the desired pH indicated in Table 1. Serially extract three times with 60 mL of methylene chloride, as outlined in Secs. 7.2 through 7.5. Collect and combine the extracts and label the combined extract appropriately.

7.9 If performing GC/MS analysis (Method 8270), the acid/neutral and base extracts may be combined prior to concentration. However, in some situations, separate concentration and analysis of the acid/neutral and base extracts may be preferable (e.g. if for regulatory purposes the presence or absence of specific acid/neutral or base compounds at low concentrations must

be determined, separate extract analyses may be warranted).

7.10 Perform the concentration (if necessary) using the Kuderna-Danish Technique (Secs. 7.11.1 through 7.11.6).

7.11 K-D technique

7.11.1 Assemble a Kuderna-Danish (K-D) concentrator (Sec. 4.3) by attaching a 10-mL concentrator tube to a 500-mL evaporation flask.

7.11.2 Attach the solvent vapor recovery glassware (condenser and collection device) (Sec. 4.4) to the Snyder column of the K-D apparatus following manufacturer's instructions.

7.11.3 Dry the extract by passing it through a drying column containing about 10 cm of anhydrous sodium sulfate. Collect the dried extract in a K-D concentrator. Rinse the Erlenmeyer flask, which contained the solvent extract, with 20 - 30 mL of methylene chloride and add it to the column to complete the quantitative transfer.

7.11.4 Add one or two clean boiling chips to the flask and attach a three-ball Snyder column. Prewet the Snyder column by adding about 1 mL of methylene chloride to the top of the column. Place the K-D apparatus on a hot water bath (15 - 20°C above the boiling point of the solvent) so that the concentrator tube is partially immersed in the hot water and the entire lower rounded surface of the flask is bathed with hot vapor. Adjust the vertical position of the apparatus and the water temperature as required to complete the concentration in 10 -20 minutes. At the proper rate of distillation the balls of the column will actively chatter, but the chambers will not flood. When the apparent volume of liquid reaches 1 mL, remove the K-D apparatus from the water bath and allow it to drain and cool for at least 10 minutes.

7.11.5 If a solvent exchange is required (as indicated in Table 1), momentarily remove the Snyder column, add 50 mL of the exchange solvent, a new boiling chip, and reattach the Snyder column. Alternatively, pour the exchange solvent into the top of the Snyder

column while the concentrator remains on the water bath in Sec. 7.11.4. Concentrate the extract, as described in Sec. 7.11.4, raising the temperature of the water bath, if necessary, to maintain proper distillation.

7.11.6 Remove the Snyder column and rinse the flask and its lower joints into the concentrator tube with 1 - 2 mL of methylene chloride or exchange solvent. If sulfur crystals are a problem, proceed to Method 3660 for cleanup. The extract may be further concentrated by using the technique outlined in Sec. 7.12 or adjusted to 10.0 mL with the solvent last used.

7.12 If further concentration is indicated in Table 1, either the micro-Snyder column technique (7.12.1) or nitrogen blowdown technique (7.12.2) is used to adjust the extract to the final volume required.

7.12.1 Micro-Snyder column technique

If further concentration is indicated in Table 1, add another clean boiling chip to the concentrator tube and attach a two-ball micro-Snyder column. Prewet the column by adding 0.5 mL of methylene chloride or exchange solvent to the top of the column. Place the K-D apparatus in a hot water bath so that the concentrator tube is partially immersed in the hot water. Adjust the vertical position of the apparatus and the water temperature, as required, to complete the concentration in 5 - 10 minutes. At the proper rate of distillation the balls of the column will actively chatter, but the chambers will not flood. When the apparent volume of liquid reaches 0.5 mL, remove the K-D apparatus from the water bath and allow it to drain and cool for at least 10 minutes. Remove the Snyder column, rinse the flask and its lower joints into the concentrator tube with 0.2 mL of methylene chloride or the exchange solvent, and adjust the final volume as indicated in Table 1, with solvent.

7.12.2 Nitrogen blowdown technique

7.12.2.1 Place the concentrator tube in a warm bath (35EC) and evaporate the solvent to the final volume indicated in Table 1, using a gentle stream of clean, dry

nitrogen (filtered through a column of activated carbon).

CAUTION: New plastic tubing must not be used between the carbon trap and the sample, since it may introduce contaminants.

7.12.2.2 The internal wall of the tube must be rinsed several times with methylene chloride or appropriate solvent during the operation. During evaporation, the tube must be positioned to avoid water condensation (i.e., the solvent level should be below the level of the water bath). Under normal procedures, the extract must not be allowed to become dry.

CAUTION: When the volume of solvent is reduced below 1 mL, semivolatile analytes may be lost.

7.13 The extract may now be analyzed for the target analytes using the appropriate determinative technique(s) (see Sec. 4.3 of this Chapter). If analysis of the extract will not be performed immediately, stopper the concentrator tube and store refrigerated. If the extract will be stored longer than 2 days it should be transferred to a vial with a PTFE-lined screw-cap or crimp top, and labeled appropriately.

8.0 QUALITY CONTROL

8.1 Any reagent blanks, matrix spikes, or replicate samples should be subjected to exactly the same analytical procedures as those used on actual samples.

8.2 Refer to Chapter One for specific quality control procedures and Method 3500 for extraction and sample preparation procedures.

9.0 METHOD PERFORMANCE

Refer to the determinative methods for performance data.

TABLE 1
SPECIFIC EXTRACTION CONDITIONS FOR VARIOUS DETERMINATIVE METHODS

Deter- minative method	Initial extraction pH	Secondary extraction pH	Exchange solvent required for analysis	Exchange solvent required for cleanup	Volume of extract required for cleanup (mL)	Final extract volume for analysis (mL) ^a
8041	#2	none	2-propanol	hexane	1.0	1.0, 0.5 ^b
8061	5-7	none	hexane	hexane	2.0	10.0
8070	as received	none	methanol	methylene chloride	2.0	10.0
8081	5-9	none	hexane	hexane	10.0	10.0
8082	5-9	none	hexane	hexane	10.0	10.0
8091	5-9	none	hexane	hexane	2.0	1.0
8100	as received	none	none	cyclohexane	2.0	1.0
8111	as received	none	hexane	hexane	2.0	10.0
8121	as received	none	hexane	hexane	2.0	1.0
8141	as received	none	hexane	hexane	10.0	10.0
8270 ^{c,d}	<2	>11	none	-	-	1.0
8310	as received	none	acetonitrile	-	-	1.0
8321	as received	none	methanol	-	-	1.0
8325	7.0	none	methanol	-	-	1.0
8410	as received	none	methylene chloride	methylene chloride	10.0	0.0 (dry)

- ^a For methods where the suggested final extract volume is 10.0 mL, the volume may be reduced to as low as 1.0 mL to achieve lower detection limits.
- ^b Phenols may be analyzed, by Method 8041, using a 1.0 mL 2-propanol extract by GC/FID. Method 8041 also contains an optional derivatization procedure for phenols which results in a 0.5 mL hexane extract to be analyzed by GC/ECD.
- ^c The specificity of GC/MS may make cleanup of the extracts unnecessary. Refer to Method 3600 for guidance on the cleanup procedures available if required.
- ^d Extraction pH sequence may be reversed to better separate acid and neutral waste components. Excessive pH adjustments may result in the loss of some analytes (see Sec. 3.2).

ANEXO X
METHOD 3540C
SOXHLET EXTRACTION

1.0 SCOPE AND APPLICATION

1.1 Method 3540 is a procedure for extracting nonvolatile and semivolatile organic compounds from solids such as soils, sludges, and wastes. The Soxhlet extraction process ensures intimate contact of the sample matrix with the extraction solvent.

1.2 This method is applicable to the isolation and concentration of water-insoluble and slightly water soluble organics in preparation for a variety of chromatographic procedures.

1.3 This method is restricted to use by or under the supervision of trained analysts. Each analyst must demonstrate the ability to generate acceptable results with this method.

2.0 SUMMARY OF METHOD

2.1 The solid sample is mixed with anhydrous sodium sulfate, placed in an extraction thimble or between two plugs of glass wool, and extracted using an appropriate solvent in a Soxhlet extractor.

2.2 The extract is then dried, concentrated (if necessary), and, as necessary, exchanged into a solvent compatible with the cleanup or determinative step being employed.

3.0 INTERFERENCES

Refer to Method 3500.

4.0 APPARATUS AND MATERIALS

4.1 Soxhlet extractor - 40 mm ID, with 500-mL round bottom flask.

4.2 Drying column - 20 mm ID Pyrex® chromatographic column with Pyrex® glass

wool at bottom.

NOTE: Fritted glass discs are difficult to decontaminate after highly contaminated extracts have been passed through. Columns without frits may be purchased. Use a small pad of Pyrex® glass wool to retain the adsorbent. Prewash the glass wool pad with 50 mL of acetone followed by 50 mL of elution solvent prior to packing the column with adsorbent.

4.3 Kuderna-Danish (K-D) apparatus

4.3.1 Concentrator tube - 10-mL, graduated (Kontes K-570050-1025 or equivalent).

A ground-glass stopper is used to prevent evaporation of extracts.

4.3.2 Evaporation flask - 500-mL (Kontes K-570001-500 or equivalent). Attach to concentrator tube with springs, clamps, or equivalent.

4.3.3 Snyder column - Three-ball macro (Kontes K-503000-0121 or equivalent).

4.3.4 Snyder column - Two-ball micro (Kontes K-569001-0219 or equivalent).

4.3.5 Springs - 1/2 inch (Kontes K-662750 or equivalent).

NOTE: The following glassware is recommended for the purpose of solvent recovery during the concentration procedures requiring the use of Kuderna-Danish evaporative concentrators. Incorporation of this apparatus may be required by State or local municipality regulations that govern air emissions of volatile organics. EPA recommends the incorporation of this type of reclamation system as a method to implement an emissions reduction program. Solvent recovery is a means to conform with waste minimization and pollution prevention initiatives.

4.4 Solvent vapor recovery system (Kontes K-545000-1006 or K-547300-0000, Ace Glass 6614-30, or equivalent).

4.5 Boiling chips- Solvent-extracted, approximately 10/40 mesh (silicon carbide or

equivalent).

4.6 Water bath - Heated, with concentric ring cover, capable of temperature control (\pm 5EC). The bath should be used in a hood.

4.7 Vials - Glass, 2-mL capacity, with polytetrafluoroethylene (PTFE)-lined screw or crimp top.

4.8 Glass or paper thimble or glass wool - Contaminant-free.

4.9 Heating mantle - Rheostat controlled.

4.10 Disposable glass pasteur pipet and bulb.

4.11 Apparatus for determining percent dry weight.

4.11.1 Drying oven - capable of maintaining 105EC.

4.11.2 Desiccator.

4.11.3 Crucibles - Porcelain or disposable aluminum.

4.12 Apparatus for grinding

4.13 Analytical balance - capable of weighing to 0.0001 g.

5.0 REAGENTS

5.1 Reagent grade inorganic chemicals shall be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended that all reagents shall conform to the specifications of the Committee on Analytical Reagents of the American Chemical Society, where such specifications are available. Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination.

5.2 Organic-free reagent water. All references to water in this method refer to organic-free reagent water, as defined in Chapter One.

5.3 Sodium sulfate (granular, anhydrous), Na₂SO₄. Purify by heating at 400°C for 4 hours in a shallow tray, or by precleaning the sodium sulfate with methylene chloride. If the sodium sulfate is precleaned with methylene chloride, a method blank must be analyzed, demonstrating that there is no interference from the sodium sulfate.

5.4 Extraction solvents - All solvents must be pesticide quality or equivalent.

5.4.1 Soil/sediment and aqueous sludge samples shall be extracted using either of the following solvent systems:

5.4.1.1 Acetone/Hexane (1:1) (v/v), CH₃COCH₃/C₆H₁₄.

NOTE: This solvent system has lower disposal cost and lower toxicity.

5.4.1.2 Methylene chloride/Acetone (1:1 v/v), CH₂Cl₂/CH₃COCH₃.

5.4.2 Other samples shall be extracted using the following:

5.4.2.1 Methylene chloride, CH₂Cl₂.

5.4.2.2 Toluene/Methanol (10:1) (v/v), C₆H₅CH₃/CH₃OH.

5.5 Exchange solvents - All solvents must be pesticide quality or equivalent.

5.5.1 Hexane, C₆H₁₄.

5.5.2 2-Propanol, (CH₃)₂CHOH.

5.5.3 Cyclohexane, C₆H₁₂.

5.5.4 Acetonitrile, CH₃CN.

6.0 SAMPLE COLLECTION, PRESERVATION, AND HANDLING

See the introductory material to this chapter, Organic Analytes, Section 4.1.

7.0 PROCEDURE

7.1 Sample Handling

7.1.1 Sediment/soil samples - Decant and discard any water layer on a sediment sample. Mix sample thoroughly, especially composited samples. Discard any foreign objects such as sticks, leaves, and rocks.

7.1.2 Waste samples - Samples consisting of multiple phases must be prepared by the phase separation method in Chapter Two before extraction. This extraction procedure is for solids only.

7.1.3 Dry waste samples amenable to grinding - Grind or otherwise subdivide the waste so that it either passes through a 1-mm sieve or can be extruded through a 1-mm hole. Introduce sufficient sample into the grinding apparatus to yield at least 10 g after grinding.

7.1.4 Gummy, fibrous, or oily materials not amenable to grinding should be cut, shredded, or otherwise reduced in size to allow mixing and maximum exposure of the sample surfaces for the extraction. The addition of anhydrous sodium sulfate to the sample (1:1) may make the mixture amenable to grinding.

7.2 Determination of percent dry weight - When sample results are to be calculated on a dry weight basis, a second portion of sample should be weighed at the same time as the portion used for analytical determination.

WARNING: The drying oven should be contained in a hood or be vented. Significant laboratory contamination may result from drying a heavily contaminated sample.

Immediately after weighing the sample for extraction, weigh 5 - 10 g of the sample into a tared crucible. Dry this aliquot overnight at 105EC. Allow to cool in a desiccator before weighing. Calculate the % dry weight as follows:

$$\% \text{ dry weight} = \frac{\text{g of dry sample}}{\text{g of sample}} \times 100$$

This oven-dried aliquot is not used for the extraction and should be disposed of appropriately once the dry weight has been determined.

7.3 Blend 10 g of the solid sample with 10 g of anhydrous sodium sulfate and place in

an extraction thimble. The extraction thimble must drain freely for the duration of the extraction period. A glass wool plug above and below the sample in the Soxhlet extractor is an acceptable alternative for the thimble.

7.3.1 Add 1.0 mL of the surrogate standard spiking solution onto the sample (see Method 3500 for details on the surrogate standard and matrix spiking solutions).

7.3.2 For the sample in each analytical batch selected for spiking, add 1.0 mL of the matrix spiking standard.

7.3.3 Consult Secs. 5.5 and 8.3 of Method 3500 for the appropriate choice of matrix spiking compounds and concentrations.

7.4 Place approximately 300 mL of the extraction solvent (Sec. 5.4) into a 500-mL round bottom flask containing one or two clean boiling chips. Attach the flask to the extractor and extract the sample for 16 - 24 hours at 4 - 6 cycles/hour.

7.5 Allow the extract to cool after the extraction is complete.

7.6 Assemble a Kuderna-Danish (K-D) concentrator (Sec. 4.3), if necessary, by attaching a 10-mL concentrator tube to a 500-mL evaporation flask.

7.7 Attach the solvent vapor recovery glassware (condenser and collection device) (Sec. 4.4) to the Snyder column of the K-D apparatus following manufacturer's instructions.

7.8 Dry the extract by passing it through a drying column containing about 10 cm of anhydrous sodium sulfate. Collect the dried extract in a K-D concentrator. Wash the extractor flask and sodium sulfate column with 100 to 125 mL of extraction solvent to complete the quantitative transfer.

7.9 Add one or two clean boiling chips to the flask and attach a three-ball Snyder column. Prewet the Snyder column by adding about 1 mL of methylene chloride to the top of the column. Place the K-D apparatus on a hot water bath (15 - 20°C above the boiling point of the solvent) so that the concentrator tube is partially immersed in the hot water and the

entire lower rounded surface of the flask is bathed with hot vapor. Adjust the vertical position of the apparatus and the water temperature, as required, to complete the concentration in 10 - 20 minutes. At the proper rate of distillation the balls of the column will actively chatter, but the chambers will not flood. When the apparent volume of liquid reaches 1 - 2 mL, remove the K-D apparatus from the water bath and allow it to drain and cool for at least 10 minutes.

7.10 If a solvent exchange is required (as indicated in Table 1), momentarily remove the Snyder column, add approximately 50 mL of the exchange solvent and a new boiling chip, and reattach the Snyder column. Concentrate the extract as described in Sec. 7.9, raising the temperature of the water bath, if necessary, to maintain proper distillation. When the apparent volume again reaches 1 - 2 mL, remove the K-D apparatus from the water bath and allow it to drain and cool for at least 10 minutes.

7.11 Remove the Snyder column and rinse the flask and its lower joints into the concentrator tube with 1 - 2 mL of methylene chloride or exchange solvent. If sulfur crystals are a problem, proceed to Method 3660 for cleanup. The extract may be further concentrated by using the techniques described in Sec. 7.12 or adjusted to 10.0 mL with the solvent last used.

7.12 If further concentration is indicated in Table 1, either micro Snyder column technique (Sec. 7.12.1) or nitrogen blowdown technique (Sec. 7.12.2) is used to adjust the extract to the final volume required.

7.12.1 Micro Snyder column technique

7.12.1.1 Add another one or two clean boiling chips to the concentrator tube and attach a two-ball micro Snyder column. Prewet the column by adding about 0.5 mL of methylene chloride or exchange solvent to the top of the column. Place the K-D apparatus in a hot water bath so that the concentrator tube is partially immersed in the hot water. Adjust the vertical position of the apparatus and the water temperature, as required, to complete the concentration in 5 - 10 minutes. At the proper rate of distillation

the balls of the column will actively chatter, but the chambers will not flood.

7.12.1.2 When the apparent volume of liquid reaches 0.5 mL, remove the K-D apparatus from the water bath and allow it to drain and cool for at least 10 minutes. Remove the Snyder column and rinse the flask and its lower joints with about 0.2 mL of solvent and add to the concentrator tube. Adjust the final volume to 1.0 - 2.0 mL, as indicated in Table 1, with solvent.

7.12.2 Nitrogen blowdown technique

7.12.2.1 Place the concentrator tube in a warm water bath (approximately 35°C) and evaporate the solvent volume to the required level using a gentle stream of clean, dry nitrogen (filtered through a column of activated carbon).

CAUTION: Do not use plasticized tubing between the carbon trap and the sample, since it may introduce contaminants.

7.12.2.2 The internal wall of the tube must be rinsed several times with the appropriate solvent during the operation. During evaporation, the solvent level in the tube must be positioned to prevent water from condensing into the sample (i.e., the solvent level should be below the level of the water bath). Under normal operating conditions, the extract should not be allowed to become dry.

CAUTION: When the volume of solvent is reduced below 1 mL, semivolatile analytes may be lost.

7.13 The extracts obtained may now be analyzed for the target analytes using the appropriate organic technique(s) (see Sec. 4.3 of this Chapter). If analysis of the extract will not be performed immediately, stopper the concentrator tube and refrigerate. If the extract will be stored longer than 2 days, it should be transferred to a vial with a PTFE-lined screw cap or crimp top, and labeled appropriately.

8.0 QUALITY CONTROL

8.1 Any reagent blanks, matrix spikes, or replicate samples should be subjected to exactly the same analytical procedures as those used on actual samples.

8.2 Refer to Chapter One for specific quality control procedures and Method 3500 for extraction and sample preparation procedures.

9.0 METHOD PERFORMANCE

Refer to the determinative methods for performance data.

TABLE 1
SPECIFIC EXTRACTION CONDITIONS FOR VARIOUS DETERMINATIVE METHODS

Determinative method	Extraction pH	Exchange solvent for analysis	Exchange solvent for cleanup	Volume of extract for cleanup (mL)	Final extract volume for analysis (mL) ^a
8041	as received	2-propanol	hexane	1.0	1.0, 0.5 ^b
8061	as received	hexane	hexane	2.0	10.0
8070	as received	methanol	methylene chloride	2.0	10.0
8081	as received	hexane	hexane	10.0	10.0
8082	as received	hexane	hexane	10.0	10.0
8091	as received	hexane	hexane	2.0	1.0
8100	as received	none	cyclohexane	2.0	1.0
8111	as received	hexane	hexane	2.0	10.0
8121	as received	hexane	hexane	2.0	1.0
8141	as received	hexane	hexane	10.0	10.0
8270 ^c	as received	none	-	-	1.0
8310	as received	acetonitrile	-	-	1.0
8321	as received	methanol	-	-	1.0
8325	as received	methanol	-	-	1.0
8410	as received	methylene chloride	methylene chloride	10.0	0.0 (dry)

- ^a For methods where the suggested final extract volume is 10.0 mL, the volume may be reduced to as low as 1.0 mL to achieve lower detection limits.
- ^b Phenols may be analyzed by Method 8041, using a 1.0-mL 2-propanol extract by GC/FID. Method 8041 also contains an optional derivatization procedure for phenols which results in a 0.5-mL hexane extract to be analyzed by GC/ECD.
- ^c The specificity of GC/MS may make cleanup of the extracts unnecessary. Refer to Method 3600 for guidance on the cleanup procedures available if required.