

# CONAMA 2020

CONGRESO NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE

Puesta a punto y validación de un método analítico para la determinación del índice de hidrocarburos del petróleo en aguas mediante cromatografía de gases y detector de ionización de llama (CG-FID)





**Autor Principal:** María de la Menta Ballesteros

**Otros autores:** Brinidilda Cofrade, Manuel Santiago, María del Mar González, Ana Moral, Roberto Aguado, Antonio Tijero

## Índice

<b>1. Palabras Clave</b> .....	3
<b>2. Resumen</b> .....	3
<b>3. Introducción</b> .....	4
3.1. Contaminantes del petróleo.....	4
3.2. TPH: presencia y problemática.....	4
3.3. Marco legislativo .....	6
3.4. Determinación de TPH en aguas continentales .....	7
3.4.1. Métodos alternativos para la determinación de TPH.....	9
<b>4. Objetivos</b> .....	11
<b>5. Materiales y métodos</b> .....	11
5.1. Reactivos .....	11
5.2. Preparación de muestra .....	12
5.2.1. Procedimiento de extracción de TPH .....	12
5.2.1.1. Preparación del disolvente de extracción con compuestos de referencia .....	12
5.2.1.2. Extracción .....	12
5.2.2. Purificación .....	13
5.2.3. Concentración.....	13
5.3. Método cromatográfico .....	14
5.4. Preparación de patrones para la recta de calibrado y fortificaciones .....	15
5.5. Controles de calidad.....	15
5.6. Cuantificación del índice de hidrocarburos.....	16
<b>6. Resultados y discusión</b> .....	17
6.1. Selección del método para la determinación de TPH .....	17
6.1.1. Método de extracción.....	17
6.1.2. Método cromatográfico.....	21
6.2. Ajuste y puesta a punto del cromatógrafo.....	23
6.3. Validación del método .....	23
6.4. Estudio estadístico.....	28
6.4.1. Linealidad y sensibilidad .....	28
6.4.2. Exactitud y recuperación .....	28
6.4.3. Precisión.....	29
6.4.3.1. Repetibilidad .....	29
6.4.3.2. Reproducibilidad .....	31
<b>7. Conclusiones</b> .....	31
<b>Bibliografía</b> .....	33
<b>ANEXO 1</b> .....	0

## 1. PALABRAS CLAVE

Cromatografía de gases; Detector FID; Validación; Hidrocarburos; TPH; Aguas continentales.

## 2. RESUMEN

Los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) se liberan al medio ambiente contaminando principalmente las aguas superficiales, especialmente en zonas cercanas a lugares de producción y almacenamiento, aunque también durante la manipulación, transporte y procesamiento del petróleo. La evaluación de esta contaminación se realiza midiendo las concentraciones de productos derivados del petróleo en el agua. Actualmente, el método más usado es la cromatografía gaseosa (CG) por su alta sensibilidad, selectividad y amplia gama de hidrocarburos capaces de detectar.

Por tanto, en este Trabajo Fin de Máster se pretende poner a punto y validar un método capaz de identificar y cuantificar hidrocarburos de cadena entre C10-C40 mediante cromatografía gaseosa con un detector de ionización de llama (CG-FID) en aguas continentales, para que así el laboratorio analítico Microal pueda ofrecer a sus clientes unos resultados fiables y reproducibles. Para ello, se hizo un análisis exhaustivo de la bibliografía disponible, comparando y analizando distintos métodos que se están empleando actualmente para la cuantificación de TPH, seleccionando finalmente un método descrito por la normativa UNE-EN ISO 9377-2. Esta normativa incluye el método de extracción y el método cromatográfico. Respecto al primero, se realizó una extracción mediante columna de purificación con Florisil usando como disolvente diclorometano, así como técnicas de evaporación para su concentración. Para el método cromatográfico, se llevó a cabo un ajuste del cromatógrafo y una recta de calibrado con disoluciones patrón formadas por una mezcla de dos aceites minerales. Finalmente, se hizo un estudio estadístico obteniendo porcentajes de recuperación, repetibilidad y reproducibilidad. Los porcentajes de recuperación alcanzados fueron satisfactorios (próximos al 100%, sin variar más del 20%), al igual que los porcentajes de repetibilidad y reproducibilidad que fueron inferiores al 10%, cumpliendo así con los intervalos de aceptabilidad establecidos. De este modo, con la realización de este Trabajo Fin de Máster se ha conseguido implantar un método estandarizado para analizar hidrocarburos en muestras de agua de forma rutinaria en Laboratorios Microal S. L.

## 3. INTRODUCCIÓN

### 3.1. Contaminantes del petróleo

Los productos del petróleo se caracterizan por ser mezclas complejas de cientos de hidrocarburos, que van desde compuestos ligeros, volátiles, de cadena corta hasta compuestos orgánicos pesados, de cadena larga y ramificada. Durante los procesos de refinación, el petróleo se separa en fracciones con puntos de ebullición similares para obtener productos de uso comercial (Llori, 2012).

Los hidrocarburos aislados por métodos analíticos para la determinación de aceite en agua (hidrocarburos no polares) se pueden agrupar en compuestos saturados (alifáticos y alicíclicos), insaturados (alquenos u olefinas y alquinos o acetilenos) y aromáticos (alquilbencenos e hidrocarburos aromáticos policíclicos o HAP) considerando estas últimas como un tipo de hidrocarburos insaturados (Urpí, 2008). Entre los compuestos aromáticos están los compuestos conocidos como BTEX, siglas correspondientes al benceno, tolueno, etilbenceno y xileno. Los HAP, excepto el naftaleno, casi no están presentes, debido a su elevado peso molecular y punto de ebullición (Wauquier, 2004).

Por tanto, cuando se analiza petróleo en agua, se determina como aceite y se incluyen los hidrocarburos poliaromáticos alquilados, heterociclos de azufre (como son los benzotiofenos y dibenzotiofenos alquilados), tetralinas y decalinas. Los hidrocarburos poliaromáticos son compuestos potencialmente cancerígenos, por lo tanto, se analizan por separado y posteriormente se adicionan al resultado final de contaminación por hidrocarburos. Los hidrocarburos totales del petróleo (TPH) proporcionan una estimación de la concentración de hidrocarburos de mayor peso molecular presente en las muestras, mientras que los HAP proporcionan una estimación de algunos de los componentes más tóxicos del petróleo, así como los componentes responsables de sus características fluorescentes (Wade et al., 2016). El petróleo que se analiza como aceite en agua contiene, además de los componentes no polares, agentes tensioactivos como el fenol y fenoles alquilados, ácidos orgánicos, ácidos nafténicos y muchos compuestos inorgánicos (Drozdova et al., 2013).

### 3.2. TPH: presencia y problemática

El petróleo y los productos derivados del petróleo, como ya se ha mencionado anteriormente, son mezclas muy complejas que contienen principalmente hidrocarburos

alifáticos y aromáticos, heterociclos, sales y concentraciones relativamente pequeñas de metales y compuestos organometálicos (Drozdova et al., 2013). La complejidad del petróleo y los productos derivados del petróleo aumenta con el número de carbono de sus componentes. Por tanto, es difícil la medición individual de hidrocarburos, siendo más práctica la medición de TPH (Llori, 2012).

Los hidrocarburos que forman parte de los TPH son compuestos inflamables, con diferentes puntos de ebullición y densidades variables. Estas propiedades influyen en el comportamiento sobre el agua, suelo o aire. Para poder interpretar, evaluar el riesgo y tomar decisiones sobre los posibles efectos peligrosos de los hidrocarburos de petróleo y garantizar la protección adecuada del medio ambiente, es muy importante conocer la toxicología, los métodos analíticos, el destino y el comportamiento ambiental, el riesgo e implicaciones tecnológicas de los hidrocarburos del petróleo (Varela, 2007). La contaminación de aceite en el medio ambiente se evalúa principalmente midiendo las concentraciones químicas de productos derivados del petróleo en la zona afectada como por ejemplo en sedimentos, biota, agua, etc. La evaluación de los niveles de contaminación ambiental de hidrocarburos en agua se determina mediante el número de TPH o mediante el índice de hidrocarburos en agua.

Los hidrocarburos de petróleo llegan al medio ambiente principalmente por derrames de petróleo crudo o derivados causados por el ser humano, ya sean por accidentes durante su transporte, manipulación o procesado. Por lo tanto, los hidrocarburos son liberados al medio ambiente contaminando los cuerpos de aguas superficiales, especialmente cerca de los lugares de producción o almacenamiento. Además, son necesarios varios años para la recuperación de los ecosistemas acuáticos expuestos a grandes cantidades de petróleo. Así, se necesitan de al menos tres años para la contaminación por petróleo crudo y diez años para la de petróleo refinado, ya que existen pocos organismos capaces de degradarlo (Llori, 2012). Por ello, es de gran importancia hacer una medición precisa del aceite disperso en aguas (Drozdova et al., 2013).

Es difícil afirmar la forma en la que el petróleo vertido afecta a la fauna y flora ya que es variada y compleja. Perturba a todo el ecosistema e incluso llegando al ser humano a través de la cadena alimentaria. El ser humano se ve muy afectado a pesar de que los organismos consumidos no presentan evidencias de contaminación ya que son de baja concentración y los efectos son a largo plazo. Los hidrocarburos se unen a los lípidos, movilizándose y uniéndose a su vez a las proteínas, pudiendo llegar incluso a los ácidos nucleicos. Esto podría provocar un posible deterioro del código genético y afectar a la memoria de la especie (Varela, 2007). La

parte del petróleo que no es soluble en agua podría formar emulsiones estables y generar metabolitos tóxicos para la biota por foto-oxidación. Algunos compuestos como cetonas alifáticas o aromáticas y ácidos carboxílicos o ésteres se oxidan generando sustancias tóxicas para la biota acuática (EPA Method 418.1 Total Recoverable Petroleum Hydrocarbons by IR. Groundwater Analytical Technical Bulletin, Winter 1991/1992, Groundwater Analytical Inc., 1992).

### 3.3. Marco legislativo

En España, la presencia de hidrocarburos en aguas continentales está regulada a través de normativas de emisión y normativas secundarias de calidad ambiental. Cuando se habla de contaminación orgánica en aguas se hace referencia a la contaminación por TPH y HAP. Sin embargo, como no hay una normativa clara y específica a nivel nacional, no todas las cuencas hidrográficas del país incorporan parámetros en sus planes de vigilancia y monitoreo. A pesar de que no exista esta legislación específica sobre contaminantes de TPH en aguas, cada empresa debe indicar sus propios límites en las autorizaciones de vertidos que les proporciona la administración competente, lo cual dependerá de la actividad de la empresa, la cantidad de vertido, etc. En la Cumbre del desarrollo sostenible del 2004 realizada en Madrid (CONAMA, 2004), se establecieron unas normativas secundarias de calidad ambiental para aguas. Estas normativas se rigen por una guía marco donde se establecen valores máximos y mínimos a considerar como referencia, los cuales se muestran a continuación en la Tabla 1.

*Tabla 1. Concentración de hidrocarburos por clases, siendo la clase excepcional de una excelente calidad, la clase 1 de muy buena calidad, la clase 2 de buena calidad y la clase 3 de calidad regular. Fuente: elaboración propia*

Grupo de elementos o compuestos	Unidad	Clase excepcional	Clase 1	Clase 2	Clase 3
Hidrocarburos	mg/L	< 0,4	0,05	0,2	1
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	mg/L	0,16	0,2	1	1
Tolueno	mg/L	-	0,3	0,3	> 0,3

En Andalucía hay unos niveles máximos establecidos por el RD 109/2015 sobre vertidos al dominio público hidráulico y al dominio público marítimo-terrestre. El RD 109/2015 establece un marco para la protección global de las aguas continentales, litorales, costeras y de transición, siguiendo los criterios empleados en la Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 23 de octubre del 2000, por la que se establece un marco comunitario de actuación



en el ámbito de la política de aguas. Así mismo, el apartado 8 del artículo 85 indica que reglamentariamente deberán establecerse las condiciones, normas técnicas y prescripciones para los distintos tipos de vertidos. En la Tabla 2 se muestran los valores límites de emisión de TPH en aguas establecidos por la comunidad andaluza.

*Tabla 2. Concentración límite de emisión de hidrocarburos totales establecido por mes, a diario y en casos puntuales, tanto en aguas costeras como superficiales según la legislación andaluza.*

*Fuente: elaboración propia*

Parámetro	Aguas costeras y de transición			Aguas superficiales		
	Valor mensual	Valor diario	Valor Puntual	Valor mensual	Valor diario	Valor puntual
<b>Hidrocarburos totales</b>	20	22	25	8,3	9,13	10

Por otro lado, este real decreto también establece los métodos analíticos de referencia más adecuados para la determinación de hidrocarburos según los distintos grupos de hidrocarburos a determinar (Tabla 3).

*Tabla 3. Métodos analíticos de referencia según el tipo de hidrocarburos a analizar, indicando el límite de cuantificación (LC) y la incertidumbre asociada. Fuente: elaboración propia*

Parámetro	Método	LC (mg/L)	Incertidumbre (%)
Hidrocarburos totales	Espectrofotometría infrarroja	0,05	35
	Gravimetría		
Hidrocarburos visibles	Examen visual	Ausencia/presencia	-
Índice de hidrocarburos (C <sub>7</sub> -C <sub>40</sub> )	Cromatografía de gases	0.05	30

### 3.4. Determinación de TPH en aguas continentales

Debido a la necesidad de cumplir los valores de referencia máximos permitidos según la legislación vigente donde se establecen los máximos permisibles de hidrocarburos de petróleo en aguas, se necesitan técnicas analíticas e instrumentales que proporcionen resultados fiables en su determinación.

Diversos estudios mencionan que la definición de TPH va a depender del método analítico usado para su determinación, debido a que su medida hace referencia a la concentración total de los hidrocarburos extraídos y medidos por un método específico, los

cuales pueden corresponder a distintas fracciones como son la fracción ligera, media y pesada del petróleo (Lynn et al., 2002) (Sadler & Connell, 2003) (Pons-Jiménez et al., 2011).

Para la determinación de la concentración de petróleo y productos derivados de éste existen distintos métodos analíticos que proporcionan información muy diferente, ya que están diseñados para extraer y medir subconjuntos ligeramente distintos de hidrocarburos del petróleo. Ningún método individual es capaz de proporcionar una medición precisa y exacta de la verdadera concentración de TPH en todos sus tipos de contaminación. Los tres métodos de análisis de TPH más utilizados son la cromatografía de gases (CG) (UNE-EN ISO 9377-2 2:2001. Calidad Del Agua. Determinación Del Índice de Hidrocarburos. Parte 2: Método Por Extracción Con Disolvente y Cromatografía de Gases., 2001) (OSPAR-Agreement 2005/15. Rereference Method of Analysis for Determination of the Dispersed Oil Content in Produced Water. Published in 2005, Taken into Force in 2007. OSPAR Commission 2005-15., 2007), absorción infrarroja (IR) (EPA Method 418.1 Total Recoverable Petroleum Hydrocarbons by IR. Groundwater Analytical Technical Bulletin, Winter 1991/1992, Groundwater Analytical Inc., 1992) y análisis gravimétrico (EPA Method 1664, Revision A: N-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM: Non-Polar Material) by Extraction and Gravimetry, 1999).

Actualmente, los métodos más utilizados para la medición de hidrocarburos de petróleo son los basados en cromatografía de gases ya que detectan una amplia gama de hidrocarburos, presentan una alta sensibilidad y selectividad, y además pueden usarse tanto para la identificación como para la cuantificación de hidrocarburos. Anteriormente, se han utilizado los métodos basados en la extracción con disolventes seguido de una medición por absorción infrarroja para la cuantificación de TPH ya que son simples, rápidos y económicos. Sin embargo, este método ha sido suspendido en Europa debido a la prohibición de la venta y uso de freones (necesarios para la extracción de hidrocarburos de la muestra). Además, los métodos de absorción infrarroja (IR) apenas proporcionan información detallada sobre la composición química del aceite, o la presencia o ausencia de otros compuestos relevantes (como aromáticos o hidrocarburos poliaromáticos). Por el contrario, incluso detectarían compuestos que normalmente no se consideran TPH, como los tensioactivos, que también pueden absorber radiación infrarroja debido a la presencia de enlaces C-H (Drozdova et al., 2013).

### 3.4.1. Métodos alternativos para la determinación de TPH

Los métodos gravimétricos son simples, rápidos, y económicos, pero no ofrecen selectividad ni información sobre el tipo de aceite detectado. Los métodos basados en gravimetría pueden ser útiles para lodos muy aceitosos y aguas residuales a concentraciones altas, pero no son adecuados para la medición de hidrocarburos ligeros ya que se perderán por evaporación (EPA Method 1664, Revision A: N-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM: Non-Polar Material) by Extraction and Gravimetry, 1999) (Niyonsaba et al., 2019).

Actualmente, la mayoría de los laboratorios emplean métodos basados en CG para la determinación de hidrocarburos de petróleo (Esmaeili & Saremnia, 2018) (Mehdi et al., 2020) (Rodríguez Calvo et al., 2020) (Sun et al., 2020). Los métodos basados en CG son adecuados para aguas superficiales, aguas residuales y otros tipos de aguas residuales descargadas desde plataformas de gas, concentrado y petróleo (Drozdova et al., 2013). Sin embargo, un estudio de Saari y colaboradores sobre comparaciones entre laboratorios indica que existe una gran variación en la configuración de funcionamiento del CG en la práctica. Los resultados muestran que la configuración de funcionamiento del CG, especialmente la del inyector, tiene una influencia significativa en el rendimiento de los sistemas de cromatografía de gases para la determinación de hidrocarburos del petróleo (Saari et al., 2010).

En sustitución al método IR se empezaron a usar fundamentalmente dos metodologías estándar basadas en CG. Una de ellas se basa en el método estándar europeo oficial ISO 9377-2:2000, desarrollado y validado para la determinación del índice de hidrocarburos en el agua por medio de cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de llama (CG-FID) (UNE-EN ISO 9377-2 2:2001. Calidad Del Agua. Determinación Del Índice de Hidrocarburos. Parte 2: Método Por Extracción Con Disolvente y Cromatografía de Gases., 2001). Los resultados obtenidos muestran diferencias sistemáticas con el método IR empleado anteriormente, por lo que el método basado en la CG se modificó (Drozdova et al., 2013). Como resultado, se obtuvo la versión modificada del método ISO 9377-2:2000, denominado método de referencia OSPAR (Comisión de Oslo-París) (OSPAR-Agreement 2005/15. Rereference Method of Analysis for Determination of the Dispersed Oil Content in Produced Water. Published in 2005, Taken into Force in 2007. OSPAR Commission 2005-15., 2007). Este método se publicó en 2005 y entró en vigor como método de referencia para determinar el contenido de aceite disperso en agua en enero de 2007.

Ambos métodos se basan en la extracción de muestras de agua con un disolvente no polar, la eliminación de sustancias polares mediante limpieza con Florisil ( $\text{MgO}_3\text{Si}$ ) y la medición por cromatografía de gases capilar utilizando una columna no polar y un detector FID, acumulando el área de pico total de compuestos eluidos. Para el método ISO 9377-2:2000 los compuestos eluidos son entre n-decano ( $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$ ) y n-tetracontano ( $\text{C}_{40}\text{H}_{82}$ ), mientras que para el método OSPAR se incluyeron hidrocarburos con puntos de ebullición entre  $98^\circ\text{C}$  y  $174^\circ\text{C}$ , es decir, de n-heptano ( $\text{C}_7\text{H}_{16}$ ) a n-decano, junto con los compuestos BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y o-/p-/m- xileno) que se determinan por separado mediante la integración y sustracción de sus áreas de pico del área total integrada. Ambos métodos no son capaces de cuantificar hidrocarburos con un punto de ebullición inferior al del n-heptano ya que estos compuestos se eluyen al comienzo del cromatograma y son interferidos por el disolvente.

El aceite en el agua producida de las instalaciones petroleras puede dispersarse o disolverse. Los componentes disueltos son los componentes más polares como los aromáticos, los ácidos y los fenoles, mientras que los componentes dispersos son los componentes alifáticos apolares, ramificados y cíclicos, además de los compuestos aromáticos y ácidos grasos de mayor peso molecular. En la extracción del agua que se produce con un disolvente orgánico se combinan los compuestos orgánicos dispersos y disueltos. Según la definición del método OSPAR y ISO 9377-2:2000 solo los hidrocarburos no polares se definen como aceite en agua. La mayoría de los otros componentes se eliminan en el proceso de limpieza (Drozdova et al., 2013).

Para alcanzar el límite de detección requerido, según el método ISO 9377-2:2000, hay que realizar una pre-concentración de los extractos por evaporación del disolvente. Por el contrario, el método OSPAR no permite ningún aparato externo para la pre-concentración, por lo que el CG debe estar equipado con un sistema de inyección de gran volumen de vaporización a temperatura programada (PTV LVI). Esta técnica puede reducir la pérdida de analitos volátiles, aumentar la sensibilidad y es una alternativa viable, rápida y automatizada a un procedimiento de pre-concentración externo. Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones como son un difícil control de la temperatura de entrada, la eliminación de disolventes y la influencia del diseño del revestimiento (Drozdova et al., 2013). Aunque el uso de PTV-LVI es una técnica establecida actualmente, no se han intentado muchos desarrollos del método para el análisis de TPH con límites de detección mejorados. El problema crítico de este método es el gran volumen de vapor resultante de la evaporación del disolvente inyectado. Esto puede provocar una pérdida del analito (parcial o completa) o picos con formas distorsionadas. La optimización de este método implica el ajuste del volumen de muestra, la velocidad de inyección de muestra y el tiempo de fase de evaporación (Casal et al., 2014) (Faustorilla Vilma et al., 2017). Resende y

colaboradores añaden otras variables más para optimizar el PTV-LVI, como la división de flujo durante la fase de evaporación y el inicio de calentamiento del inyector (Resende et al., 2017). Por tanto, es una técnica con muchas variables experimentales que deben optimizarse antes de su uso en procedimientos analíticos (Resende et al., 2017).

## 4. OBJETIVOS

En este estudio, desarrollado en el laboratorio de análisis Microal S.L., se pretende poner a punto y validar un método capaz de identificar y cuantificar hidrocarburos de cadena entre C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> en aguas continentales mediante cromatografía de gases y acoplando un detector de ionización de llama (CG-FID), para así poder realizar el análisis de forma rutinaria y ofrecer a los clientes unos resultados fiables y reproducibles.

Por tanto, los objetivos principales son:

- ✓ Seleccionar el método más adecuado de análisis de índice de hidrocarburos mediante una búsqueda exhaustiva de la bibliografía disponible que cumpla con la normativa acreditada UNE-EN ISO/IEC 17025 de controles de calidad.
- ✓ Poner a punto el equipo de cromatografía acoplado al detector FID conforme a la normativa UNE-EN ISO 9377-2 para obtener una recta de calibrado y cuantificar los analitos de interés.
- ✓ Llevar a cabo los primeros pasos para la validación del método seleccionado bajo la normativa UNE-EN ISO 9377-2 con el fin de empezar a realizar el análisis de forma rutinaria proporcionándole datos fiables al cliente.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Reactivos

Todos los reactivos deben ser de calidad analítica reconocida y resultar convenientes para el uso específico al que van destinados. En este estudio se ha empleado agua ultrapura (18,2 MΩ cm) del sistema de purificación PURELAB®. Por otro lado, los compuestos de referencia empleados han sido el n-decano y n-tetracontano de la marca Scharlab, para facilitar la lectura de los cromatogramas. Como agente de extracción se ha empleado diclorometano de calidad HPLC marca Scharlab. Para la determinación de los tiempos de retención de cada hidrocarburo se emplea una mezcla estándar de C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub> (Saturated Alkanes Standard) marca Supelco. Como

estándar del método se ha usado QC-Estandar Solution for EN ISO 9377-2 también de la marca Supelco y como estándar del calibrado se ha usado “Mineral oil standard mixture type A and B”, el cual está compuesto por una mezcla de dos aceites minerales.

## 5.2. Preparación de muestra

En este estudio se ha seleccionado 900 mL de una muestra de agua continental de la que se conoce que contiene hidrocarburos. La muestra debe estar debidamente etiquetada bajo el cumplimiento de la normativa ISO/ICE 17025 (UNE-EN ISO/IEC 17025. Requisitos Generales Para La Competencia de Los Laboratorios de Ensayo y Calibración, 2005) y conservarse bajo las indicaciones de la norma ISO 5667-3. Debe mantenerse a una temperatura de 4°C aproximadamente y extraerse lo antes posible, como máximo dentro de un periodo de cuatro días tras el muestreo, para así evitar pérdida de los analitos más volátiles o su posible deterioro.

### 5.2.1. Procedimiento de extracción de TPH

#### 5.2.1.1. Preparación del disolvente de extracción con compuestos de referencia

En primer lugar, se prepara una disolución madre de disolvente de extracción. Para ello, se disuelven 20 mg de n-tetracontano en el agente de extracción ( $\text{Cl}_2\text{CH}_3$ ), se añaden 20  $\mu\text{L}$  de n-decano y se diluye hasta 1000 mL con  $\text{Cl}_2\text{CH}_3$  (esto dependerá del número de muestras a analizar). Esta disolución es estable hasta 6 meses si se conserva herméticamente cerrada en un refrigerador aproximadamente a 4°C.

A continuación, inmediatamente antes de su utilización, se prepara la disolución patrón del disolvente de extracción. Para ello se prepara la disolución madre con un volumen de  $\text{Cl}_2\text{CH}_3$  10 veces mayor. En este caso, se añaden 25 mL de la disolución madre y se diluye hasta 250 mL con  $\text{Cl}_2\text{CH}_3$  en un matraz aforado.

#### 5.2.1.2. Extracción

En primer lugar, la muestra de agua continental se enfría hasta una temperatura de 10°C con objeto de evitar pérdidas del agente de extracción debido a su volatilización. A continuación, se acidifica hasta un pH 2 con HCl 12 M. Después, se añaden 80 g de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) para evitar la formación de emulsiones. Se añaden 50 mL de la disolución patrón del disolvente

y se deja durante 30 min en agitación. Es muy importante mantener el recipiente cerrado para evitar pérdidas de analitos por volatilización. Después, se hace una separación por decantación y finalmente se recoge la fase orgánica, la cual contiene los hidrocarburos. En este paso se debe evitar que pase agua y que entre finalmente a la columna de purificación de Florisil (silicato de magnesio), ya que la muestra va a recubrir la superficie del sulfato de sodio y podría estropear la columna.

### 5.2.2. Purificación

Se transfiere la fase orgánica con el agente de extracción a una columna de Florisil compuesta por un tubo SPE (extracción en fase solida) de doble capa que contiene  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (capa superior) y Florisil (capa inferior) separados y empaquetados con tubos de teflón o polietileno. Las partículas de Florisil están formadas por una malla 60/100 (150-200  $\mu\text{m}$ ) y el  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  es de pureza del 99,99% y densidad 2,68 g/mL. Para ello, se ha empleado la columna de extracción Supelco (Supelclean™ Florisil®/ $\text{Na}_2\text{SO}_4$  SPE Tube). El  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ayuda a la eliminación de residuos acuosos de la muestra que puede dificultar el rendimiento del Florisil y/o análisis CG siguiente. Esta purificación se realiza en un equipo con vacío (Manifold) para que se produzca la extracción a través de la columna.

Para llevar a cabo el proceso de purificación, primero se realiza un aclarado con 4 mL del agente de extracción ( $\text{Cl}_2\text{CH}_3$ ) y, posteriormente, se hace pasar el extracto. Por último, se hacen pasar 2 x 10 mL de  $\text{Cl}_2\text{CH}_3$  para así arrastrar y recoger los hidrocarburos en los tubos de ensayo. Finalmente, el eluato se recoge en un matraz de fondo redondo. De esta forma se retienen los compuestos polares y los apolares (hidrocarburos) se eluyen con el disolvente apolar ( $\text{Cl}_2\text{CH}_3$ ).

### 5.2.3. Concentración

Durante el proceso de extracción se trabaja con grandes cantidades de disolvente por lo que es necesario realizar distintas técnicas de concentración. Primero, el extracto de la muestra se concentra en un rotavapor hasta un volumen de aproximadamente 6 mL. Es importante realizar este paso en unos pocos minutos para evitar pérdida de compuestos. Después, se concentra el extracto hasta un volumen ligeramente inferior a 1 mL por medio de una corriente suave de nitrógeno. Por último, se calcula el volumen exacto del extracto por pesada. Finalmente, se transfiere una alícuota del extracto obtenido a un vial con septum para el análisis por cromatografía de gases. Para el control del ensayo se realiza un blanco de diclorometano y

otro del blanco de calibrado que se realizan paralelamente a lo largo de todo el proceso para detectar posibles contaminaciones.

### 5.3. Método cromatográfico

Para la determinación de hidrocarburos se ha utilizado un equipo de cromatografía de gases de la marca Perkin Elmer modelo "Clarus 580" equipado con un detector de ionización de llama (FID) y acoplado a un inyector automático de la misma marca. El equipo está provisto además de una columna capilar no polar específica para la separación de hidrocarburos del petróleo de la marca Scharlab (SC-1 Fase: 100% dimetilpolisiloxano de 30 m de longitud). Las especificaciones de éste se detallan en la Tabla 4.

*Tabla 4. Especificaciones para el ajuste de los parámetros de la columna que se utiliza para el análisis cromatográfico.*

Especificaciones	Columna
Tipo de columna	SC-1
Espesor	0,25 µm
Longitud	30 m
Diámetro Interno (ID)	0,25 mm
Temperatura máxima	330-350°C

En la Tabla 5 se detallan las condiciones de trabajo con las que se ha desarrollado el método. Hay que destacar que la inyección es de tipo Split (inyector de división) típico de muestras complejas.

*Tabla 5. Condiciones cromatográficas para el análisis de TPH.*

Temperatura del Inyector	280 °C	
Temperatura del detector	320 °C	
Gas portador	H <sub>2</sub>	
	Flujo (mL/min)	1,4
Volumen de Inyección	1 µL	
	Tipo	Split 20:1
Tiempo de análisis	21 min	
<b>Temperatura programada de la columna</b>		
Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Razón de programación (°C/min)
40	4	-
320	15	30



La muestra vaporizada se divide en dos partes, una minoritaria que se transfiere a la columna y otra mayoritaria que se expulsa al inyector por la válvula Split. Con este tipo de inyección se evita sobrecargar la columna con los efectos negativos que se puedan producir.

## 5.4. Preparación de patrones para la recta de calibrado y fortificaciones

Para realizar el calibrado se utiliza un estándar “Mineral oil standard mixture type A and B” compuesto por dos tipos de aceites minerales. Se realiza un ensayo a 5 concentraciones diferentes del estándar Mineral oil (Tabla 6). Además, se añade un blanco de  $\text{Cl}_2\text{CH}_3$  y otro blanco de calibrado para el control de los resultados.

*Tabla 6. Volúmenes de estándar y disolvente de extracción adicionados para la preparación de la recta de calibrado.*

Concentración (mg/mL)	Volumen estándar (mL)	Volumen disolvente extracción (mL)
1	0,1	0,9
2	0,2	0,8
5	0,5	0,5
7	0,7	0,3
10	0,5	0

El estándar “QC-standard solution (Mineral oil A and B)” se emplea para hacer las fortificaciones y controles. En este estudio se han realizado tres fortificaciones, a nivel bajo (1,11 mg/L), medio (5,5 mg/L) y alto (11 mg/L), para calcular el porcentaje de recuperación y evaluar la exactitud y precisión del método. Es importante que el patrón utilizado en el calibrado sea diferente al de las fortificaciones para asegurar que no hay error o deterioro.

## 5.5. Controles de calidad

En este estudio se emplean diferentes controles de calidad, como son el análisis de muestra control, análisis de blanco, análisis por duplicado y fortificaciones:

- Análisis de muestra control: se prepara un control de un estándar conocido de n-alcano a 500 mg/L para ajustar el tiempo de retención ( $t_r$ ) de los picos desde el n-heptano ( $\text{C}_7\text{H}_{16}$ ) al n-tetracontano ( $\text{C}_{40}\text{H}_{82}$ ). Esta disolución se utiliza para obtener información relativa a los tiempos de retención de los n-alcanos con objeto de caracterizar

los hidrocarburos en la muestra. Es importante señalar que tanto el calibrado como las fortificaciones no se pueden realizar con este estándar ya que presenta todos los hidrocarburos desde C<sub>7</sub>-C<sub>40</sub> y por tanto se usa únicamente para la cualificación de los picos y el ajuste del t<sub>r</sub>. Por otro lado, al disolvente de extracción se le adiciona el n-decano y el n-tetracontano, tanto para la muestra como para el calibrado sirviendo de guía en el cromatograma y, no interfiriendo en la cuantificación.

- **Análisis de blanco:** para ello se realizan análisis sin los analitos a determinar. En este caso, se realiza un blanco del agente de extracción (Cl<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) y otro blanco del disolvente de extracción. Estos dos blancos han de añadirse en cada ensayo que se realice, ya sea para el calibrado como para el análisis de muestras, y se tratan en paralelo durante todo el proceso de extracción. Este tipo de control se realiza para detectar posibles contaminaciones.

- **Análisis por duplicado:** se realiza por duplicado cada una de las determinaciones, para así poder comparar los resultados y conocer la desviación estándar que se produce en la medida, pudiendo evaluar por tanto la repetibilidad del método.

- **Fortificaciones:** se realizan tres fortificaciones distintas a partir del estándar “QC-standard solution (Mineral oil A and B)”. Esta disolución se utiliza para verificar en qué medida el sistema de cromatografía de gases es apropiado en lo que respecta a la resolución de los n-alcenos y a la respuesta del detector, evaluando la exactitud del método.

## 5.6. Cuantificación del índice de hidrocarburos

El objetivo de este estudio es validar el método descrito por la normativa ISO 9377-2:2000 para así cuantificar el índice de hidrocarburos en una muestra de agua. Para ello, se realiza el análisis a través del CG-FID, de donde se obtiene una señal, la cual se refleja como área del pico cromatográfico. El área del pico es proporcional a la concentración de los analitos. Por tanto, a través de la recta de calibrado se puede conocer la concentración instrumental. Para cuantificar el índice de hidrocarburo se transforma la concentración instrumental en la concentración final mediante la Ecuación 1.

$$\text{Índice de Hidrocarburo (mg/L)} = \frac{mT \text{ (mL)} \times [C]I \text{ (mg/mL)}}{900 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde:

$m_T$  = masa o volumen total de muestra final (puede ser en g o mL ya que son equivalentes asumiendo que  $\rho=1$ ) que se obtiene restando la masa del recipiente vacío al lleno tras la extracción.

$[C]_i$  = concentración instrumental.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se exponen los resultados preliminares obtenidos para la selección, puesta a punto y validación de un nuevo método que se implantará en laboratorios Microal, S.L. para la determinación del índice de hidrocarburos en aguas continentales.

### 6.1. Selección del método para la determinación de TPH

Para la selección del método es primordial una búsqueda previa exhaustiva de la bibliografía hasta el momento actual. De esta forma, se pueden conocer los distintos métodos que se aplican, así como las distintas normativas por las que se rigen, seleccionando finalmente el más adecuado para laboratorios Microal, S.L. Para ello, se han tenido en cuenta factores clave como la disponibilidad de equipamiento propio del laboratorio y el material que se ha de adquirir para la consecución del método.

A continuación, se detalla la búsqueda realizada para la elección del método de extracción y método cromatográfico donde se describen las características fundamentales de cada uno.

#### 6.1.1. Método de extracción

Con este método se pretende llevar a cabo una extracción de hidrocarburos adecuada, evitando cualquier posible pérdida de analito. En este estudio se pretenden detectar los hidrocarburos de cadenas entre  $C_{10}$ - $C_{40}$ , por lo que la búsqueda se ha centrado fundamentalmente en la bibliografía que describe técnicas que se basen en la CG, además de por la disponibilidad de este equipo ya en el laboratorio. Por otro lado, también es importante revisar en estudios previos los reactivos y patrones que se han utilizado, así como las fortificaciones realizadas para tenerlas en cuenta durante la ejecución del análisis que se seleccione.

A continuación, en la Tabla 7 se muestran los distintos métodos de extracción, procedimiento, agentes de extracción, reactivos y estándares más empleados.

Tabla 7. Comparación de los distintos métodos para la extracción de TPH.

Método	Tipo	Muestra	Extracción	Estándar	Filtrado y Secado	Concentrado	Referencia
1 (EPA 3510c)	Líquido - Líquido	500 mL	3 x 30 mL Cl <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Diesel Fuel No.2 (1500, 2000 y 3000 mg/L)	Lana de vidrio y Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> anhidro	Rotavapor (hasta 5 mL) Kuderna Danish (hasta 1 mL)	(Moreira & Guevara, 2011)
2 (ISO 9377-2:2000)	Líquido - Líquido	900 mL + aceite mineral estándar	50 mL (éter de petróleo, hexano o CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	C <sub>10</sub> -C <sub>40</sub>	2 g Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 2 g de Florisil + 10 mL de disolvente de extracción	Se ajusta a 1 mL	(Vasilios G, 2013)
3	-	-	-	-	-	-	(Goodman et al., 2015)
4	SPE (automatizada y programable)	-	con n-hexano o Cl <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-	Membrana Gore-Tex	Por evaporación	(Turner, 2003)
5 (ISO 9377-2:2000)	Líquido - Líquido	-	Florisil	C <sub>10</sub> -C <sub>40</sub> en heptano a 0,05 mg/mL	-	Rotavapor y N <sub>2</sub> (hasta < 1 mL) y completar hasta 1 mL con n-pentano	(Drozdova et al., 2013)
OSPAR	Líquido - Líquido	-	Florisil	mezcla de C <sub>7</sub> /C <sub>10</sub> /C <sub>20</sub> /C <sub>40</sub> y TEX en pentano a 0,005 mg/mL	-	Pre-concentrado <i>in situ</i>	
6	Líquido - Líquido	1 L + patrón interno (α-terfenilo)	3 x 50 mL Cl <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	-	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Rotavapor: extracto + estándar interno (endrostano 5-α)	(Kim et al., 2013)
7	SPME	Muestra A: 932 g Muestra B: 999 y 996 g	4 x 50 mL Cl <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	+ 100 µL o-terfenilo (200 µg/mL) + 100 µL mezcla PAH en 1 mL acetona	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Rotavapor y N <sub>2</sub> (hasta 0,5 mL)	(Wang et al., 2002)
8 (ISO 9377-2:2000)	Líquido-Líquido	900 mL	acidificar a pH 2 (ác. mineral) + 80 g MgSO <sub>4</sub> + 50 mL disol. patrón microseparador Columna de Florisil	n-alcanos C <sub>20</sub> -C <sub>40</sub> ~ 50 µg/mL de cada uno	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kuderna Danish (hasta 6 mL) N <sub>2</sub> (hasta < 1 mL) Completar hasta 1 mL con agentes de extracción	(UNE-EN ISO 9377-2:2001. Calidad Del Agua. Determinación Del Índice de Hidrocarburos. Parte 2: Método Por Extracción Con Disolvente y Cromatografía de Gases., 2001)

Como se observa en la Tabla 7, en la mayoría de los estudios se ha llevado a cabo la extracción LLE (líquido-líquido) debido a que es una técnica de muestreo universal “limpia”, mucho más desarrollada y extendida entre los laboratorios que la SPE (extracción en fase sólida) o SPME (microextracción en fase sólida). En el método 4 se propone la técnica SPE usando una membrana Gore-Tex (diseñada específicamente para eliminar el agua residual a partir de extracciones de disolventes orgánicos de forma física), reduciendo así la mano de obra requerida, tiempo de análisis, cantidad de disolvente, la necesidad de agentes de secado químico (los cuales pueden tener un efecto perjudicial sobre el análisis cuantitativo posterior) y aparatos para evaporación. En el método 7 se ha propuesto la técnica SPME, la cual es una técnica de muestreo “sin disolvente” en la que una fibra con un recubrimiento polimérico se suspende sobre el espacio superior de la muestra o se sumerge en ella. Esta membrana tiene una alta afinidad por los compuestos orgánicos volátiles (COV) con coeficiente de partición favorables (baja solubilidad y alta volatilidad). Es una técnica que se suele usar para mezclas complejas que se obtienen de derrames muy erosionados, por la alta sensibilidad de los COV. A pesar de sus beneficios estas técnicas son más caras, por lo que solo se suelen usar en casos de aguas muy contaminadas. En otros casos se realiza la extracción LLE combinada con la SPE, utilizando para ello columnas de Florisil (métodos 2, 5 y 8), lo cual mejora la extracción.

En todos los métodos se utilizan muestras iniciales de grandes volúmenes (entre 50 y 1000 mL) debido a que, por lo general, las muestras que se van a analizar deberían tener bajas concentraciones de hidrocarburos y debe ser representativa del lugar. En algunos casos, se le añade a la muestra un aceite mineral estándar (método 2), un patrón interno  $\alpha$ -terfenilo (método 6) o el estándar o-terfenilo y una mezcla de PAH (método 7) para el control del método.

Para llevar a cabo una extracción adecuada, se suelen hacer entre tres y cuatro lavados con un disolvente (de tipo hidrocarburo o mezcla con punto de ebullición entre 36°C-69°C). En este estudio se ha seleccionado el diclorometano ( $\text{Cl}_2\text{CH}_2$ ) como agente de extracción por su disponibilidad, menores costes y por ser el más común, pero se podría hacer un estudio posterior para llevar a cabo la optimización del proceso de extracción con otros disolventes.

En la etapa de pre-concentración, se concentra hasta un volumen  $< 1$  ml en todos los casos mediante diferentes técnicas de evaporación como la rotaevaporación, Kuderna Danish y empleo de nitrógeno gas. Finalmente, se lleva a un volumen de 1 ml con el agente de extracción, excepto en la técnica OSPAR del método 5 donde la pre-concentración es *in situ* ya que en la técnica se inyecta un gran volumen (hasta 50  $\mu\text{L}$ ).

### 6.1.2. Método cromatográfico

En la Tabla 8 se muestran todas las condiciones fundamentales para tener en cuenta en un análisis CG-FID. A pesar de que no todos los estudios se rigen por la misma normativa, las condiciones cromatográficas son bastante parecidas. Hay que mencionar que, aunque la técnica se base en una normativa, el ajuste del cromatógrafo está supeditado al equipo y analista y serán necesarias diversas modificaciones para obtener un resultado óptimo y fiable. En cuanto a la columna cromatográfica hay que destacar que debe ser entre 15-30 metros fundamentalmente y la más empleada es la columna de sílice fundida DB-5MS, en algunos casos se incluye una pre-columna capilar de sílice fundida desactivada. La temperatura de la columna oscila entre los 290-340°C, con lo cual será importante hacer un ajuste de ésta para que no se produzca ninguna degradación de los analitos a analizar. En todos los casos la inyección es de 1 µl ya sea split o splitless (con o sin división en el inyector). El método 7 realiza la inyección mediante un inyector automático, lo cual le proporciona mayor exactitud y reproducibilidad entre análisis.

En este estudio se ha seleccionado la metodología de análisis para la determinación de TPH según la normativa UNE-EN ISO 9377-2. Esta selección está basada en la aplicación de una normativa estandarizada y oficial como las proporcionadas por la organización internacional de normalización (ISO).

Tabla 8. Comparación de los distintos métodos para el análisis cromatográfico de TPH.

Método	CG	Columna	Longitud	T	Gas portador	Vol. Inyección	Tª entrada	Tª FID	LOD	Referencia
1 (EPA 8015 b)	Clarus 400 Perkin	Elite 5	-	-	-	-	-	-	-	(Moreira & Guevara, 2011)
2 (ISO 9377-2) C <sub>10</sub> -C <sub>40</sub>	Perkin Elmer Clarus 400	DB 5MS	30 m	315 °C	He 20 psi	1 µl (splitless)	310 °C	320 °C	0,1 mg/L	(Vasilios G, 2013)
3 (EPA 8015) Indica programa de horno	Perkin Elmer Clarus 680	Elite -1	15 m	330 °C	He 1,8 mL/min	Programable (split-splitless) Flujo 10 mL/min	-	350 °C	-	(Goodman et al., 2015)
4 C <sub>10</sub> -C <sub>40</sub>	Agilent 5890N	HP5	-	-	-	50 µl (split-splitless) Inyector de alto rendimiento	-	-	-	(Turner, 2003)
5 ISO 9377-2:2000 C <sub>10</sub> -C <sub>40</sub>	Agilent 6890 <sup>a</sup>	RTX-5MS + pre-columna	-	340 °C	He 3 mL/min	1 µL (splitless)	40 °C	340 °C	0,1 mg/L	(Drozdova et al., 2013)
OSPAR C <sub>7</sub> -C <sub>10</sub> (parámetros optimizados para el vaporizador)	Agilent 7890 <sup>a</sup>	-	-	-	-	50 µL Inyector UNI S 2100	35 °C	340 °C	0,1 mg/L	
6 C <sub>10</sub> -C <sub>40</sub>	Agilent 7890A	DB-5 columna capilar de sílice fundida	30 m	290 °C	He 2,5 mL/min	-	50 °C	300 °C	0,52 µg/L	(Kim et al., 2013)
7 Control de sistema y datos HP 61034C MS Chemstation (Serie DOS)	Hewlett-Packard (HP) 5890	-	-	-	-	Inyector automático HP7673	-	-	-	(Wang et al., 2002)
8 ISO 9377-2:2000	-	DB-5MS sílice fundida + pre-columna (sílice fundida desactivada)	5 - 30 m	50-300 °C	H <sub>2</sub> 0,8 bar	1 µL (no discriminatorio)	40 °C	300 °C	-	(UNE-EN ISO 9377-2 2:2001, 2001)



## 6.2. Ajuste y puesta a punto del cromatógrafo

Una vez realizado el estudio bibliográfico se ha llevado a cabo la puesta a punto del cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de llama (CG-FID). Para ello, se ha realizado varios ensayos de aptitud en el cromatógrafo con el blanco del agente de extracción ( $\text{Cl}_2\text{CH}_3$ ), con el fin de conseguir una determinación adecuada del índice de hidrocarburos conforme a la norma UNE-EN ISO 9377-2 y en concreto, poder cuantificar los hidrocarburos que van del n-decano al n-tetracontano en muestras de agua continentales.

Después de seleccionar las condiciones cromatográficas como se indica en la normativa UNE-EN ISO 9377-2 y tras el ensayo de aptitud con  $\text{Cl}_2\text{CH}_3$ , se realiza un primer ensayo con el estándar certificado de la mezcla de n-alcano a una concentración de 500 mg/L, para así detectar y seleccionar el tiempo de retención ( $t_r$ ) de cada hidrocarburo. Bajo las condiciones cromatográficas descritas en el apartado de materiales y métodos (Tablas 4 y 5) se ha obtenido una buena resolución de los picos cromatográficos (Anexo I).

## 6.3. Validación del método

Para la validación se ha llevado a cabo, en primer lugar, un ajuste del calibrado con el fin de poder realizar la cuantificación de hidrocarburos en muestras de aguas continentales. Para dicho calibrado se ha empleado el estándar "Mineral oil standard mixture type A and B" (compuesto por dos tipos de aceites minerales) abarcando el intervalo de concentración entre 1 y 10 mg/mL. Para asegurar que la columna y el equipo están limpios y la señal es estable se ha incluido, además, un blanco del disolvente de extracción y otro de  $\text{Cl}_2\text{CH}_3$ . Si se representan gráficamente las señales obtenidas en el cromatograma frente a las concentraciones de los patrones se obtiene una recta de calibrado de ecuación  $y = bx + a$ , donde "b" es la pendiente y "a" la ordenada en el origen (Jurado, 2017). La recta que se ha obtenido en este estudio se muestra a continuación en la Figura 2.

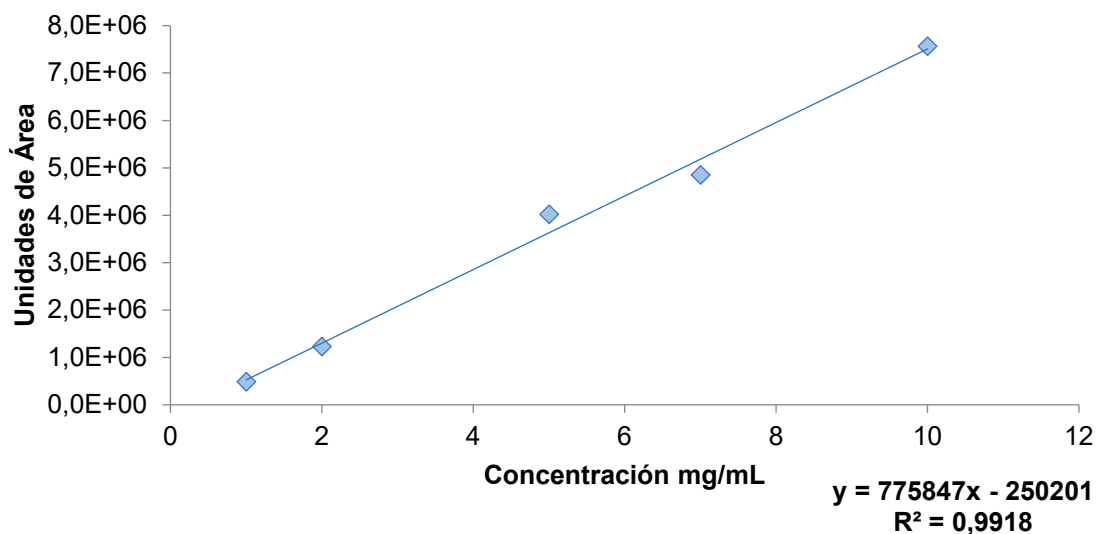


Figura 2. Recta de calibrado para la determinación del índice de hidrocarburos.

Se puede observar una linealidad aceptable ya que el valor de  $R^2$  es 0,9918. Además, para confirmar dicha linealidad se realiza un nuevo cálculo de la concentración de hidrocarburos en los patrones (Tabla 9), para lo que se calcula el índice de hidrocarburos (Ec. 1) a partir de la señal obtenida por la CG-FID y se evalúa la exactitud de ambos resultados a través de la Ecuación 2 (% recuperación). Se puede observar que, al hacer dicho cálculo, se obtienen valores de exactitud dentro del intervalo 90-110%. Con estos dos criterios de calidad ( $R^2 > 0,99$  y variación de la exactitud  $< 10\%$ ) puede confirmarse que la recta de calibrado es adecuada.

$$\%R = \frac{C_2}{C_1} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

Donde:

$C_1$ : Concentración a la que se ha fortificado (mg/L)

$C_2$ : Concentración del índice de hidrocarburos obtenida de la Ec. 1 (mg/L)

A continuación, se han realizado tres fortificaciones en una muestra de agua continental a tres niveles diferentes de concentración con el estándar "Mineral oil standard type A and B" (uno a nivel bajo de 1,11 mg/L, otro a nivel medio de 5,5 mg/L y otro a nivel alto a 11 mg/L) cubriendo el intervalo de concentración de la recta de calibrado. Estos ensayos se han realizado por duplicado y en tres días diferentes. Al igual que en el caso anterior, para controlar que se realiza un correcto análisis, se han añadido al ensayo un blanco del disolvente de extracción y otro blanco de  $Cl_2CH_3$ . En la Figura 3 se muestran los tres ensayos realizados a diferentes niveles de fortificación.

Hay que tener en cuenta que los cromatogramas que se muestran en la Figura 3 son los de los tres ensayos realizados sin tener escala en el lateral y sin tener en cuenta la forma de integración de los hidrocarburos descritos en la norma ISO 9377-2:2000. Según dicha normativa, el cromatograma de gases se integra entre los picos del n-decano ( $C_{10}H_{22}$ ) y del n-tetracontano ( $C_{40}H_{82}$ ). La integración se inicia antes del pico de n-decano, al nivel de la señal del frente del pico de disolvente, y se pone una marca justo antes del pico del n-tetracontano. Para visualizarlo se muestra en la Figura 4 un cromatograma ampliado donde se detalla la integración que se ha llevado a cabo.

*Tabla 9. Resultados de recuperación (%) del recalcu de los patrones para determinar la exactitud de la recta de calibrado obtenida.*

Concentración (mg/mL)	Índice de hidrocarburo (mg/L)	Recuperación (%)
1	0,952	95,2
2	1,903	95,1
5	5,497	109,9
7	6,575	93,9
10	10,073	100,7

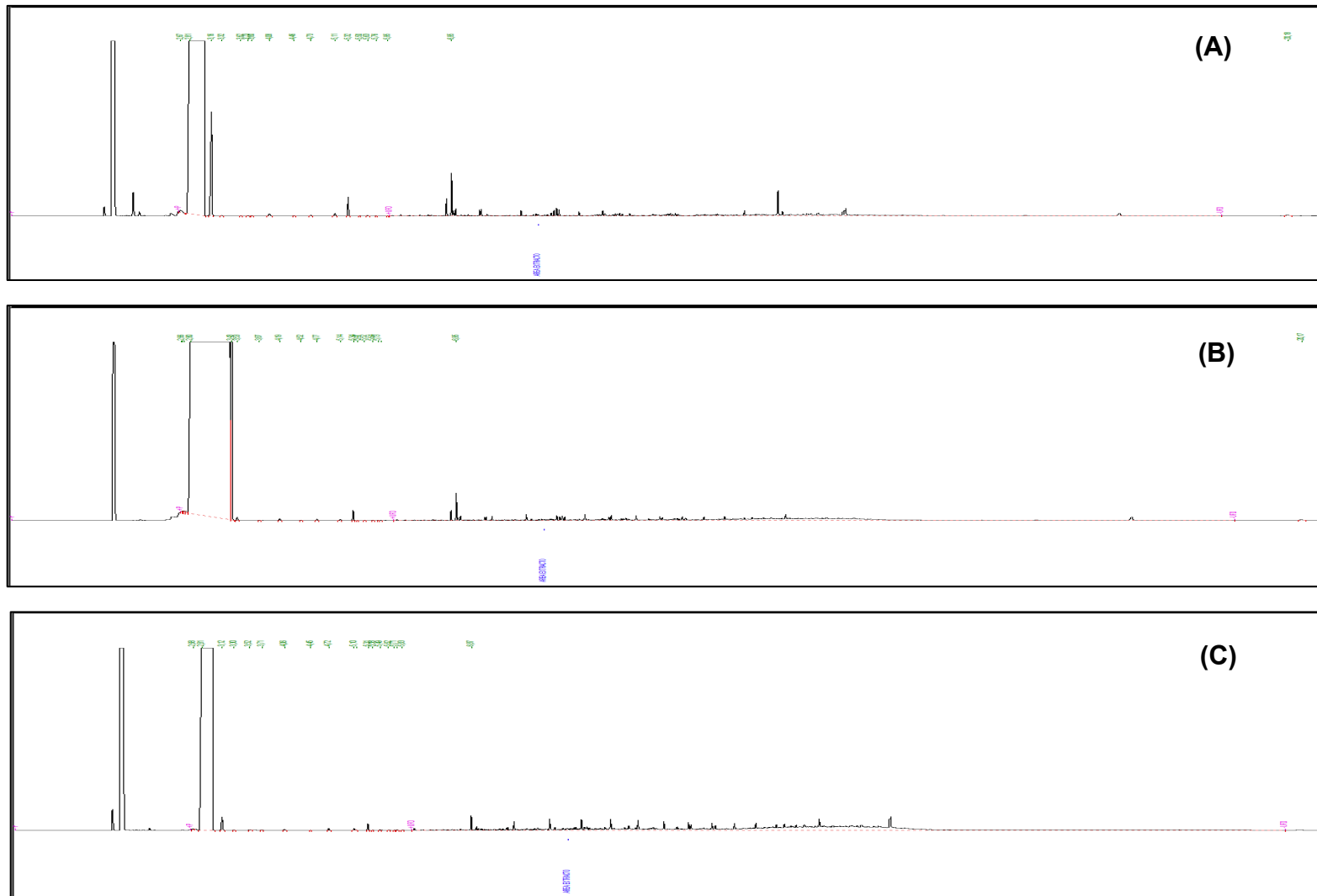


Figura 3. Cromatogramas obtenidos para el nivel bajo de 1,11 mg/L (A), medio de 5,5 mg/L (B) y alto de 11 mg/L (C) de una muestra de agua continental.

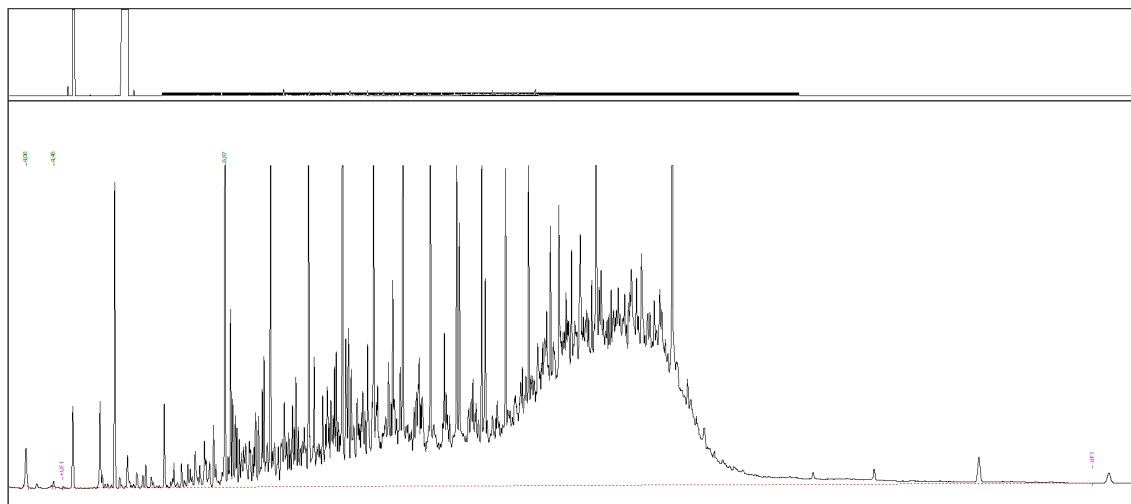


Figura 4. Cromatograma ampliado de la integración realizada.

En la Figura 5 se muestra la superposición de los tres cromatogramas donde se aprecia el aumento de la señal conforme aumenta la concentración de la fortificación, ya que el área de la curva del pico es proporcional a la concentración. Esto último, además, se puede confirmar cuando se hace el estudio estadístico posterior del índice de hidrocarburos, donde se observa un claro aumento del índice de hidrocarburos conforme aumenta la concentración de la fortificación.

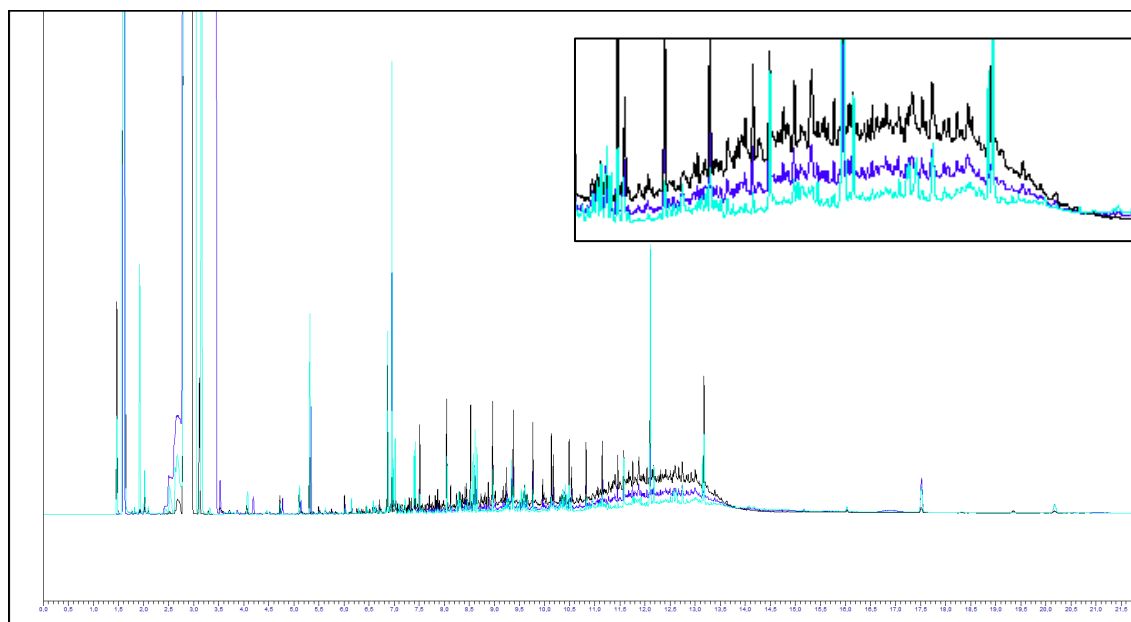


Figura 5. Superposición de los cromatogramas obtenidos de las tres fortificaciones realizadas siendo la de color celeste el ensayo a nivel bajo (1,11 mg/L), la de color azul a nivel medio (5,5 mg/L) y la de color negro a nivel alto (11 mg/L). En la imagen insertada se muestra una ampliación en la que se aprecia la variación de la señal con la concentración de la fortificación.

## 6.4. Estudio estadístico

Con los datos que se han obtenido de los ensayos se ha realizado un estudio estadístico con el que se ha podido obtener el porcentaje de recuperación (%R) en los tres niveles estudiados, repetibilidad y reproducibilidad.

### 6.4.1. Linealidad y sensibilidad

Se ha realizado una recta de calibrado entre 1 y 10 mg/mL para cubrir todo el intervalo de concentración, cuyo coeficiente de correlación es  $R^2 = 0,9918$  (apartado 4.3.). Este coeficiente define la linealidad, siendo el intervalo de aceptabilidad  $0,9999 \leq R^2 \leq 0,99$  (Huber, 2004), por lo que se puede afirmar que se ha obtenido una linealidad aceptable. Además, se puede calcular la linealidad en función de la dispersión de los datos alrededor de la línea de calibración a través de la desviación estándar relativa de la pendiente ( $RSD_b$ ) según la Ecuación 3.

$$\%RSD_b = \frac{s_b}{b} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

$s_b$ : desviación estándar de la pendiente

$b$ : pendiente de la recta de calibrado

El umbral típico de la desviación estándar relativa es  $RSD \leq 5\%$  y un  $RSD$  mayor que  $5\%$  indicaría una falta de linealidad (González & Herrador, 2007). En este estudio se ha obtenido un  $RSD$  del  $3,7\%$ . También el estudio de exactitud realizado anteriormente (apartado 4.3), cuyos resultados se encuentran dentro del intervalo de aceptabilidad, cumple el criterio de variación de la exactitud menor al  $10\%$ , confirmándose por tanto que la recta de calibrado es adecuada.

Por otro lado, la pendiente o coeficiente de regresión indica la sensibilidad de calibración. En este estudio se ha obtenido una pendiente de  $b = 775847$  y dado que, a mayor pendiente mayor sensibilidad, se puede afirmar que la curva de calibrado obtenida presenta una buena sensibilidad y linealidad.

### 6.4.2. Exactitud y recuperación

En este estudio la exactitud (error sistemático) se ha expresado como porcentaje de recuperación y, para ello, se ha realizado el análisis a distintos niveles de fortificación (1,11; 5,5

y 11 mg/L), por duplicado y en tres días distintos. El tanto por ciento de recuperación viene dado por la Ec. 2, para lo que hay que conocer el índice de hidrocarburo a través de la Ec. 1.

En la Tabla 10 se puede observar que los porcentajes de recuperación obtenidos son satisfactorios ya que todos son cercanos al 100%, no variando más de un 20%.

*Tabla 10. Porcentajes de recuperación obtenidos de cada ensayo a distintos niveles de concentración (bajo de 1,11 mg/L, medio de 5,5 mg/L y alto de 11 mg/L) en tres días diferentes y por duplicado.*

Nivel	Réplica	Día 1	Día 2	Día 3
1	1	88,08	97,46	97,82
	2	87,47	95,91	91,97
2	1	84,97	92,84	91,13
	2	96,04	87,10	98,18
3	1	93,23	93,19	89,28
	2	94,53	93,79	97,90

Aunque es deseable lograr un factor de recuperación lo más cercano posible al 100%, no existe un valor mínimo establecido (Raposo & Ibelli-bianco, 2020). En este caso, se puede decir que el aumento de la concentración no afecta a la respuesta del método, ya que no se encontraron diferencias significativas entre las cantidades añadidas y recuperadas.

### 6.4.3. Precisión

Se pretende evaluar la semejanza de los resultados obtenidos entre los distintos ensayos realizados. Para ello en este estudio se ha realizado un estudio de la precisión evaluando los parámetros estadísticos de repetibilidad y reproducibilidad.

#### 6.4.3.1. Repetibilidad

El parámetro estadístico que caracteriza a la repetibilidad es la desviación estándar o preferiblemente el coeficiente de variación (desviación estándar relativa). En este estudio la repetibilidad se evalúa mediante el cálculo de la desviación estándar relativa (RSD) según la Ecuación 4 (González & Herrador, 2007), lo que permite evaluar la incertidumbre (error aleatorio).

$$\%RSD = \frac{S}{X} \times 100$$

**Ec. 4**

Donde:

S: desviación estándar

X: promedio del grupo muestral

La RSD se define como el valor absoluto del coeficiente de variación (Portuondo Paisan & Portuondo Moret, 2010). En la Tabla 11 se muestran los valores de coeficiente de variación máximos que se consideran aceptables para un método analítico según Horwitz (Horwitz, 1982) y la Asociación oficial de químicos analíticos (AOAC, 2000) en función del porcentaje del analito en la muestra.

Tabla 11. Coeficientes de variación máximos ( $CV_{m\acute{a}x}$ ) de aceptación en relación al porcentaje del analito en la muestra (% A), según Horwitz (I) y la AOAC (II).

Concentración de analito (%A)	$CV_{m\acute{a}x}$ I (%)	$CV_{m\acute{a}x}$ II (%)
100	2,0	1,3
10	2,8	1,8
1	4,0	2,7
0,1	5,7	3,7
0,01	8,0	5,3
0,001	11,3	7,3
0,0001	16,0	11,0

En este estudio se ha hecho uso del resultado del índice de hidrocarburos obtenido en tres días diferentes, para los tres niveles de fortificación y por duplicado. Según los intervalos de aceptabilidad de CV (Tabla 11) los resultados que se han obtenido en esta validación (Tabla 12) son aptos y, por tanto, válidos. Para la fortificación de nivel 1 (1,11 mg/L) el  $CV_{m\acute{a}x}$  no debe ser superior al 16% (Horwitz) o superior al 11% (AOAC) siendo los obtenidos inferiores al 5%, al igual que para el nivel 2 (5,5 mg/L) que no superan el 9% y para el caso del nivel 3 (11 mg/L) el  $CV_{m\acute{a}x}$  no debe superar 11,3% (Horwitz) o 7,3% (AOAC) siendo en todos los casos menor del 7%.

Tabla 12. Repetibilidad ( $CV\%$ ) obtenida de las fortificaciones a distintos niveles de concentración (bajo de 1,11 mg/L, medio de 5,5 mg/L y alto de 11 mg/L) en tres días diferentes.

Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
0,494	8,650	0,977
1,131	4,510	0,451
4,361	5,267	6,516



### 6.4.3.2. Reproducibilidad

La reproducibilidad se expresa con los mismos parámetros matemáticos que la repetibilidad (Rudaz & Feinberg, 2018). En este estudio se ha realizado un estudio de precisión intermedia en el mismo laboratorio. Para ello, se ha llevado a cabo un estudio estadístico comparando los resultados obtenidos en tres días diferentes y con dos analistas distintos, usando como valor experimental el promedio de los resultados obtenidos por duplicado. De ello, se pudo obtener un valor estimado del parámetro de reproducibilidad (Tabla 13).

*Tabla 13. Reproducibilidad obtenida de las tres fortificaciones a distintos niveles de concentración (bajo de 1,11 mg/L, medio de 5,5 mg/L y alto de 11 mg/L) en tres días diferentes.*

Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
5,060	2,793	0,217

En la Tabla 13 se puede observar que los resultados obtenidos entran dentro del intervalo aceptable propuesto por Horwitz y la AOAC (Tabla 11) y además son semejantes a los obtenidos en el análisis de la repetibilidad. En general, tanto los resultados de repetibilidad como de reproducibilidad han sido satisfactorios ya que son inferiores al 10% en ambos casos (Tablas 12 y 13). Sin embargo, sería conveniente realizar un estudio de reproducibilidad entre laboratorios externos, aunque como supone costes elevados y periodos largos de tiempo, al menos, se debería ampliar la validación de manera global, con más tipos de matrices y repeticiones de hasta 5 días para así poder llevar a acreditar el método bajo la normativa ISO 9377-2:2000 por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) y con la finalidad de proporcionar al cliente validez en los resultados.

## 7. CONCLUSIONES

En este estudio se ha realizado la validación del método descrito por la normativa UNE-EN ISO 9377-2 para la cuantificación del índice de hidrocarburos en muestras de aguas continentales, donde se han obtenido resultados aptos para poder empezar a aplicar el método en los laboratorios Microal, S.L. de forma rutinaria.

Se ha realizado un estudio bibliográfico exhaustivo del que se puede concluir que la mejor normativa para la consecución de los objetivos es la ISO 9377-2 debido a que es la más utilizada en el territorio europeo, lo que favorece posibles ensayos de reproducibilidad entre laboratorios y confianza en los resultados para el cliente, además, de la ya disponibilidad del equipamiento necesario para llevar a cabo el método. Asimismo, según los datos bibliográficos,

el método CG-FID es el más empleado y desarrollado para la detección del índice de hidrocarburos.

Se ha podido comprobar que el método de extracción líquido-líquido empleando diclorometano como disolvente extractor es eficaz, rápido y reproducible. Sin embargo, debido al empleo de grandes cantidades de disolvente durante la extracción ha sido necesario utilizar técnicas de concentración como la rotaevaporación y corriente de gas nitrógeno antes de analizar en el cromatógrafo.

Se han conseguido seleccionar unas condiciones adecuadas de análisis cromatográfico para la cuantificación del índice de hidrocarburos. Para ello, se ha realizado una curva de calibrado con un estándar conocido en un intervalo de concentración con el que se obtiene una alta linealidad y sensibilidad. Asimismo, se ha fortificado una muestra de agua continental a tres niveles de concentración, de donde se ha obtenido un porcentaje promedio de recuperación satisfactorio del 93%, no encontrándose diferencias significativas entre las cantidades añadidas y recuperadas. Por ello, puede deducirse que un aumento de la concentración de hidrocarburos no afecta a la respuesta del método. Finalmente, se han obtenido resultados de repetibilidad y reproducibilidad aptos, ya que en ambos casos han sido inferiores al 10%, lo cual indica una alta precisión de los resultados.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Llori, K. J. R. (2012). *Determinación de residuos de hidrocarburos totales de petróleo (fracción diesel) en aguas de la Reserva de Producción Faunística Cuyabeno, mediante la técnica de cromatografía de gases con detector de ionización de llama*. {Tesis de maestría, Escuela de ciencias químicas, Facultad de ciencias exactas y naturales, Universidad de Ecuador}.
- [2] Urpí, J. L. (2008). *Tecnología y margen de refino del petróleo*. Díaz de Santos. <https://doi.org/http://www.diazdesantos.es/ediciones>
- [3] Wauquier, J. P. (2004). *El refino del petróleo: Petróleo crudo, Productos petrolíferos, Esquemas de fabricación*. Díaz de Santos.
- [4] Wade, T. L., Sericano, J. L., Sweet, S. T., Knap, A. H., & Guinasso, N. L. G. (2016). Spatial and temporal distribution of water column total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and total petroleum hydrocarbons (TPH) from the Deepwater Horizon (Macondo) incident. *Marine Pollution Bulletin*, 103, pp. 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.12.002>
- [5] Drozdova, S., Ritter, W., Lendl, B., & Rosenberg, E. (2013). Challenges in the determination of petroleum hydrocarbons in water by gas chromatography (hydrocarbon index). *Fuel*, vol. 113, pp. 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.03.058>
- [6] Varela, G. C. (2007). *Informe final: Diseño monitoreo frente derrames de Hidrocarburos*. PRASA.
- [7] EPA method 418.1, (1992). Total recoverable petroleum hydrocarbons by IR. Groundwater analytical technical bulletin, Winter 1991/1992, Groundwater analytical Inc.
- [8] Lynn, T. B., Lynn, A. C., & Balog, D. (2002). Analysis of SITE program TPH field trial data for SW-846 method 9074 - The petroFLAG hydrocarbon analyzer. *International on-site* (Conference 2002, January 22-25; 10<sup>a</sup> ed, pp. 1–15). Dexsil Corporation.
- [9] Sadler, R., & Connell, D. (2003). Analytical methods for the determination of total petroleum hydrocarbons in soil. In A. Langley, M. Gilbey, & B. Kennedy (Eds.), *Proceedings of the fifth national workshop on the assessment of site contamination. National environmental protection council-Environmental protection and Heritage Council* (pp. 133–150). enHEALTH.
- [10] Pons-Jiménez, M., Guerrero-Peña, A., Zavala-Cruz, J., & Alarcón, A. (2011). *Removal of oil and petroleum compounds from soils with different physical and chemical characteristics*. vol. 27, pp. 1–15.
- [11] UNE-EN ISO 9377-2 2:2001. (2001). Calidad del agua. Determinación del índice de hidrocarburos. Parte 2: Método por extracción con disolvente y cromatografía de gases.
- [12] OSPAR-Agreement 2005/15. (2007). Reference method of analysis for determination of the dispersed oil content in produced water. OSPAR Commission 2005-15. Malahide.
- [13] EPA method 1664, (1999). Revision A: n-hexane extractable material (HEM; oil and Grease) and silica gel treated n-hexane extractable material (SGT-HEM: non-polar material) by extraction and gravimetry.

- [14] Niyonsaba, E., Wehde, K. E., Yerabolu, R., & Kilaz, G. (2019). Determination of the chemical compositions of heavy, medium, and light crude oils by using the distillation, precipitation, fractionation mass spectrometry (DPF-MS) method. *Fuel*, vol. 255, pp. 115852. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2019.115852>
- [15] Esmaeili, A., & Saremnia, B. (2018). Comparison study of adsorption and nano filtration methods for removal of total petroleum hydrocarbons from oil- field wastewater. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, vol. 171, pp. 403–413. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2018.07.058>
- [16] Mehdi, M., Mofrad, G., Pourzamani, H., & Mehdi, M. (2020). Heliyon In situ treatment of metalworking wastewater by chemical addition-dissolved air flotation coupled with UV , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> & ZnO. *Heliyon*, vol. 6, pp. e03091. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03091>
- [17] Rodríguez Calvo, A., Silva castro, G. A., Olicón Hernández, D. R., González López, J., & Calvo, C. (2020). Biodegradation and absorption technology for hydrocarbon-polluted water treatment. *Applied Sciences*, vol. 10, pp. 841. <https://doi.org/10.3390/app10030841>
- [18] Sun, Z., Chen, X., Yang, K., Zhu, N., & Lou, Z. (2020). Science of the total environment the progressive steps for TPH stripping and the decomposition of oil refinery sludge using microbubble ozonation. *Science of the Total Environment*, vol. 712, pp. 135631. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135631>
- [19] Saari, E., Perämäki, P., & Jalonen, J. (2010). Evaluating the impact of GC operating settings on GC–FID performance for total petroleum hydrocarbon (TPH) determination. *Microchemical Journal*, vol. 94, pp. 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.09.004>
- [20] Casal, C. S., Arbilla, G., & Corr, S. M. (2014). *Alkyl polycyclic aromatic hydrocarbons emissions in diesel/biodiesel exhaust*. Atmospheric Environment. vol. 96. pp. 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.07.028>
- [21] Faustorilla Vilma, M., Chen, Z., Dharmarajan, R., & Naidu, R. (2017). Determination of total petroleum hydrocarbons in Australian groundwater through the improvised gas chromatography–flame ionization detection technique. *Journal of Chromatography Science*, vol. 55, pp. 775–783. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx038>
- [22] Resende, R., Araújo, L. C., Dariva, L. C., Rebac, K. N., Pinto, I. A., Rodrigues, J. P., Amal, Saeki, J. K., Silva, T. S., Takematsu, E. K., Tiene, N. V., Aguiar-oliveira, E., Buosi, R.E., Deziderio, M. A., & Kaminura, E. S. (2017). *LWT - Food Science and Technology Potential application of four types of tropical fruits in lactic fermentation*. vol. 86, pp. 254–260. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.005>
- [23] UNE-EN ISO/IEC 17025. (2005). Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, PP. 38
- [24] Moreira, S. B. E., & Guevara, P. (2011). *Análisis de hidrocarburos de petróleo en agua mediante cromatografía de gases*. Sangolqui.
- [25] Vasilios G, S. (2013). *Developing improved lab analysis methods to detect total petroleum hydrocarbons (TPH)*. Applied Spectroscopy Reviews, vol. 48, pp. 458–486.
- [26] Goodman, W., Kwoka, T., Thomas, J., PerkinElmer, I., & Shelton, C. (2015). Accelerating the analysis of petroleum hydrocarbons by method 8015 with the application of novel GC oven

technology. *Perkin Elmer*, INC Shelton, CT.

- [27] Turner, D. (2003). Determination of TPH in water using SPE-DEX and LVI-GC-FID. *Anatune Ltd.*, vol. 44, 149–151.
- [28] Kim, M., Hee, S., Won, J., Hyuk, U., Jung, J., Yong, S., Geon, J., Joo, C., Kim, E., Myung, G., Baek, S., Choi, H., & Joon, W. (2013). Petroleum hydrocarbon contaminations in the intertidal seawater after the Hebei Spirit oil spill-effect of tidal cycle on the TPH concentrations and the chromatographic characterization of seawater extracts. *Water Research*, vol. 47, pp. 758–768. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.050>
- [29] Wang, Z., Li, K., Fingas, M., Sigouin, L., & Menard, L. (2002). Characterization and source identification of hydrocarbons in water samples using multiple analytical techniques. *Journal of Chromatography A*, vol. 971, pp. 173–184. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01003-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01003-8)
- [30] Jurado, J. M. (2017). *Aplicación de microsoft excel a la química analítica: validación de métodos analíticos. {Departamento de Química Analítica (Universidad de Sevilla)}*.
- [31] Huber, W. (2004). On the use of the correlation coefficient  $r$  for testing the linearity of calibration functions. *Accreditation and Quality Assurance*. vol. 9, pp. 726. <https://doi.org/10.1007/s00769-004-0854-6>
- [32] González, A. G., & Herrador, M. Á. (2007). *A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. vol. 26, pp. 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>
- [33] Raposo, F., & Ibelli-bianco, C. (2020). Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines. *Trends in Analytical Chemistry*. pp. 115913. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115913>
- [34] Portuondo Paisan, Y., & Portuondo Moret, J. (2010). La repetibilidad y reproducibilidad en el aseguramiento de la calidad de los procesos de medición. *Tecnología Química*, vol. XXX, pp. 117–121. <https://doi.org/http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445543770014>
- [35] Horwitz, W. (1982). *Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs*. *Analytical Chemistry*. vol. 54, pp. 67-76. <https://doi.org/10.1021/ac00238a765>
- [36] AOAC. (2000). *AOAC International. Method Validation Program (OMA/PVM Department), including Appendix D: Guidance for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis*.
- [37] Rudaz, S., & Feinberg, M. (2018). Trends in analytical chemistry from method validation to result assessment: established facts and pending questions. *Trends in Analytical Chemistry*, vol.105, pp. 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.013>

## ANEXO 1: Cromatograma del análisis del estándar n-alcano con la nomenclatura de cada pico de hidrocarburo (C10-C40).

