

Análisis del TPH y
las Fracciones de
Hidrocarburos Alifáticos
y Aromáticos en Matrices
de Interés Medioambiental

O. Pindado
R. M^a. Pérez
S. García



Análisis del TPH y
las Fracciones de
Hidrocarburos Alifáticos
y Aromáticos en Matrices
de Interés Medioambiental

O. Pindado
R. M^a. Pérez
S. García

Toda correspondencia en relación con este trabajo debe dirigirse al Servicio de Información y Documentación, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Ciudad Universitaria, 28040-MADRID, ESPAÑA.

Las solicitudes de ejemplares deben dirigirse a este mismo Servicio.

Los descriptores se han seleccionado del Thesaurus del DOE para describir las materias que contiene este informe con vistas a su recuperación. La catalogación se ha hecho utilizando el documento DOE/TIC-4602 (Rev. 1) Descriptive Cataloguing On-Line, y la clasificación de acuerdo con el documento DOE/TIC.4584-R7 Subject Categories and Scope publicados por el Office of Scientific and Technical Information del Departamento de Energía de los Estados Unidos.

Se autoriza la reproducción de los resúmenes analíticos que aparecen en esta publicación.

Catálogo general de publicaciones oficiales
<http://www.060.es>

Depósito Legal: M-26385-2011
ISSN: 1135-9420
NIPO: 721-14-011-1

Editorial CIEMAT

CLASIFICACIÓN DOE Y DESCRIPTORES

S54

ORGANIC COMPOUNDS; HYDROCARBONS; AROMATICS; CONTAMINATION;
ENVIRONMENTAL IMPACTS; QUALITATIVE CHEMICAL ANALYSIS

Análisis del TPH y las Fracciones de Hidrocarburos Alifáticos y Aromáticos en Matrices de Interés Medioambiental

Pindado, O.; Pérez, R. M^a.; García, S.

46 pp. 36 ref. 9 figs. 33 tablas

Resumen:

Se presentan los métodos para analizar el contenido de TPH y varias fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos presentes en muestras de suelo y agua subterráneas contaminadas por hidrocarburos. Como parte del proyecto BIOXIS-OIL, el análisis de estos parámetros es fundamental e indispensable para conocer el nivel de contaminación de partida, para diseñar los métodos de descontaminación y finalmente para evaluar el grado de descontaminación obtenido. El análisis de las matrices involucra diferentes etapas de extracción como la radiación por microondas, etapas de purificación y fraccionamiento basadas en la extracción e fase sólida y finalmente el análisis cromatográfico con detector de ionización de llama. Los procedimientos han presentado parámetros de calidad analítica aceptables y han sido validados mediante el análisis de diversos materiales de referencia certificada.

Analysis of TPH and Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons Fractions in Environmental Interest Matrices

Pindado, O.; Pérez, R. M^a.; García, S.

46 pp. 36 ref. 9 figs. 33 tables

Abstract:

Analytical methods to analyze TPH and several aliphatic and aromatic fractions present in soil and groundwater samples contaminated by hydrocarbons are showed. As a part of BIOXISOIL project, analyzing these parameters is fundamental and indispensable to know the initial contamination level, design an adequate method to decontaminate it and eventually assess decontamination accomplished. Analysis of both matrices involve different extraction stages such as microwave radiation, clean up steps based on solid phase extraction and finally a chromatograph analysis with flame ion detector. Analytical procedures have showed satisfactory analytical quality parameters and have been validated against several certified reference materials.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Aspectos teóricos sobre el cálculo de la incertidumbre.....	3
2.1. Instrumentación, materiales y reactivos.....	5
2.1.1. Instrumentación.....	5
2.1.2. Materiales.....	5
2.1.3. Patrones, disolventes y gases.....	6
2.2. Preparación de patrones y reactivos.....	6
2.3. Procedimientos de limpieza.....	7
2.4. Tratamiento de la muestra.....	8
2.4.1. Muestras de suelo.....	9
2.4.1.1. Extracción con microondas.....	9
2.4.1.2. Extracción en fase sólida (SPE) para muestras de suelo.....	9
2.4.2. Muestras de agua.....	10
2.4.2.1. Acondicionamiento de la muestra acuosa.....	10
2.4.2.2. Extracción en fase sólida (SPE) para muestras acuosas.....	10
2.5. Análisis cromatográfico.....	12
2.5.1. Condiciones de operación.....	12
2.5.2. Identificación de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos.....	12
2.5.3. Definición de los rangos de hidrocarburos.....	13
2.5.4. Cuantificación de los rangos de hidrocarburos.....	14
2.5.4.1. Factores de calibración para los hidrocarburos alifáticos.....	14
2.5.4.2. Factores de calibración para los hidrocarburos aromáticos.....	16
2.5.5. Cálculo de las concentraciones en muestras sólidas y líquidas.....	17
3. RESULTADOS.....	19
3.1. Validación de la metodología.....	19
3.1.1. Linealidad.....	19
3.1.2. Sesgo.....	20
3.1.3. Trazabilidad.....	22
3.1.4. Precisión.....	24
3.1.5. Límites de detección y cuantificación.....	25
3.2. Cálculo de la incertidumbre.....	26
3.2.1. Incertidumbre en las muestras sólidas.....	26
3.2.1.1. Incertidumbre asociada al área.....	27
3.2.1.2. Incertidumbre asociada al volumen final de muestra.....	28
3.2.1.3. Incertidumbre asociada al cálculo de los factores de calibración.....	29
3.2.1.3.1. Incertidumbre del área cromatográfica de las disoluciones de calibrado.....	29
3.2.1.3.2. Incertidumbre asociada a la preparación de las disoluciones de calibrado.....	30
3.2.1.4. Incertidumbre asociada a la masa de muestra analizada.....	32
3.2.1.5. Incertidumbre asociada a la recuperación.....	33
3.2.1.6. Estimación de la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida.....	34
3.2.2. Incertidumbre en las muestras de agua subterráneas.....	35
3.2.2.1. Incertidumbre asociada al volumen inicial de muestra.....	36
3.2.2.2. Incertidumbre asociada a la recuperación.....	36
3.2.2.3. Cálculo de la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida.....	37
4. CONCLUSIONES.....	39
5. AGRADECIMIENTOS.....	43
6. REFERENCIAS.....	45

1. INTRODUCCIÓN.

Los derivados del petróleo son uno de los contaminantes más comunes en el medio ambiente. Dentro de este término nos podemos encontrar una gran variedad de hidrocarburos; alifáticos, aromáticos y una menor cantidad de compuestos heterocíclicos, desde gases ligeros a residuos pesados [1, 2]. Una vez han llegado a los ecosistemas, los productos derivados del petróleo pueden tener diferentes destinos, por ejemplo los compuestos de menor peso molecular son susceptibles a volatilizarse y pasar a formar parte de la atmósfera, mientras que los compuestos más pesados tienden a disolverse lentamente en los suelos. De hecho, los hidrocarburos procedentes del petróleo son considerados uno de los contaminantes más comunes de los suelos [3].

Los hidrocarburos totales del petróleo, conocido por sus siglas en inglés TPH, es un parámetro no específico y definido por el método de análisis que actualmente se emplea para expresar la concentración total de los hidrocarburos del petróleo no polares. Los métodos para determinar el TPH están basados en la cromatografía, en la espectroscopia infrarroja y también en las técnicas de gravimetría. Actualmente, los métodos cromatográficos son los más empleados ya que pueden emplearse para identificar y cuantificar el nivel de TPH. De forma general, estos métodos consisten en una etapa de extracción, encargada de separar el contenido del TPH de la matriz en la que se encuentra disuelto, una posterior etapa de limpieza que puede ser necesaria para eliminar posibles interferencias o bien favorecer el fraccionamiento del TPH, y finalmente una medida mediante el empleo de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC/FID). Actualmente existe numerosa información relacionada con el contenido del TPH en suelos [2, 4-7], aguas [8-12] y también numerosos estudios de remediación de suelos contaminados [13-16].

Se ha puesto de manifiesto que muchos de los hidrocarburos que forman parte del TPH tienen similares propiedades fisicoquímicas intrínsecas, por lo que pueden ser clasificados en grupos o fracciones cuando queremos considerar su comportamiento, su evolución en el medioambiente o su toxicidad [1]. Es por ello, que los métodos de fraccionamiento del TPH están empezando a utilizarse, incluyendo entre ellos los métodos que se basan en el número equivalente de carbono (EC) definido por la “*Total Petroleum Hydrocarbons Criteria Working Group (TPHCWG)*”. Este método se basa en referenciar los

compuestos aromáticos y alifáticos en función de sus puntos de ebullición normalizados con respecto a una especie que se toma de referencia: el *n*-hexano [17, 18].

La norma ISO 16703 sobre la determinación del TPH en suelos, es el protocolo más empleado por los laboratorios analíticos para el análisis rutinario de estos compuestos en suelos contaminados con aceites [19]. Además, el comité europeo para la estandarización presentó un borrador para la determinación cuantitativa del TPH en residuos sólidos que también se ha aplicado a suelos contaminados [20-22]. De acuerdo a este borrador, la muestra sólida es extraída con una mezcla de heptano / acetona, a continuación se procede a realizar una limpieza de la fase orgánica a través de unos cartuchos de *Florisil* y en último lugar se analiza el eluato mediante GC-FID. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto que la extracción no es ideal debido a que varios compuestos pueden ser co-extraídos generando un efecto matriz que deteriora la calidad del posterior análisis. Además, hay que destacar que cambios en los sistemas de extracción empleados, los disolventes o el efecto de la humedad del suelo afectan significativamente a la calidad de la medida del TPH [2]. Todos estos efectos pueden ser minimizados mediante el empleo de etapas de limpieza o fraccionamiento más efectivas.

La Directiva 2006/118/EC del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea sobre la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro, establece unos valores máximos de nitratos y pesticidas, pero no así de hidrocarburos [23]. Sin embargo los hidrocarburos del petróleo tienen efectos negativos sobre la salud humana y los sistemas ecológicos, y su presencia en suelos, aguas subterráneas y aguas superficiales está considerado problemático [24]. Actualmente los métodos empleados para medir el contenido de TPH en aguas consisten en realizar una extracción líquido líquido con disolventes orgánicos, con los consiguientes problemas asociados. Además debido a las características físico-químicas de estos compuestos, los hidrocarburos disueltos en agua tienden a retenerse en las paredes de vidrio de los recipientes que los contienen.

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar unos métodos de análisis que minimice los anteriores inconvenientes, con el fin de analizar y cuantificar de forma precisa el contenido del TPH y fracciones de hidrocarburos tanto en muestras de suelo y como de agua subterránea. Una vez se han desarrollado los métodos de análisis, es necesario realizar un estudio de validación con el fin de demostrar la viabilidad de las metodologías propuestas. La validación consiste en la determinación de los principales parámetros de calidad analíticos: precisión, exactitud, sesgo, linealidad, límites de detección, límites de cuantificación, sensibilidad y por último evaluar la incertidumbre de medida [25].

1.1. Aspectos teóricos sobre el cálculo de la incertidumbre.

El término de incertidumbre puede definirse como “un parámetro asociado con el resultado de una medida que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser razonablemente atribuidos a la medida” [26]. De este modo, la incertidumbre del resultado de una medida implica una falta de conocimiento del valor exacto de la medida. Hay muchas posibles fuentes de incertidumbre en una medida analítica, empezando por la incompleta o errónea definición del mensurando, los muestreos no representativos, diferentes condiciones de la medida, los errores aleatorios del personal que realiza la medida, la resolución instrumental, los valores inexactos de los patrones y los materiales de referencia, el método de medida asumido o las variaciones en la repetición de medidas. Todas estas fuentes de incertidumbre no son necesariamente independientes y no tienen por qué tener el mismo peso a la incertidumbre final, pero en la práctica, todas deben ser tomadas en consideración y ser perfectamente evaluadas [26-29].

Existen varias aproximaciones para evaluar la incertidumbre de un análisis químico aunque no por ello deja de ser un procedimiento complejo y que no siempre se realiza. Uno de las más empleadas es la aproximación “bottom-up” que divide el método analítico en varias etapas. Así la incertidumbre de cada paso está constituida por componentes aleatorios y sistemáticos que pueden ser evaluados mediante un análisis repetido de medidas. Esta aproximación ha sido satisfactoriamente aplicada a diferentes métodos analíticos [30-36].

La evaluación de la incertidumbre asociada con un resultado analítico implica cuatro etapas principales: especificar el mensurando, identificar las fuentes de incertidumbre, cuantificar todas las contribuciones y finalmente, calcular la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida. Las componentes de la incertidumbre pueden ser clasificadas en incertidumbres tipo A, que son evaluadas por el análisis estadístico de una serie de medidas e incertidumbre tipo B, donde la evaluación no se basa en métodos estadísticos. Para calcular la incertidumbre combinada, todas las componentes de la incertidumbre deben estar expresadas como incertidumbres estándar y ser combinadas según de acuerdo a las reglas para componentes dependientes o independientes [28]. Por último, la incertidumbre expandida define un intervalo sobre donde el mensurando debe estar comprendido con un determinado valor de confianza. Se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada por un factor de cobertura, siendo el más empleado un valor de $K=2$. De este modo, hay un 95 %

de probabilidades de que el resultado se encuentre dentro del intervalo definido por la incertidumbre expandida.

2. PARTE EXPERIMENTAL.

2.1. Instrumentación, materiales y reactivos.

2.1.1. Instrumentación.

- › Cromatógrafo de gases Agilent 7820A con detector FID e inyector automático.
- › Sistema de Microondas [Ethos Sel].
- › Distribuidor de vacío para SPE de 12 puertos [Agilent].
- › Bomba de vacío.
- › Balanza analítica [Denver Instrument TB-215D].
- › Granatario [Sartorius T2101].
- › Vitrina.
- › Agitador Vortex.
- › Sistema de evaporación con corriente de nitrógeno.
- › Sistema de agua desionizada.

2.1.2. Materiales.

- › Columna cromatográfica de sílice fundida HP5 (30 m longitud; 0,32 mm diámetro interno; 0,25 μm fase estacionaria). N° serie: USA540816H.
- › Cartuchos de fase normal Isolute sorbent EPH (25 mL / 5 g).
- › Cartuchos de fase inversa Waters Sep-pak tC_{18} (6 mL / 1 g).
- › Jeringas de 50, 100, 250, 500, 1000 y 5000 μL [Hamilton y SGE].
- › Probetas de 10, 25, 50, 100 y 250 mL.
- › Vasos de precipitados.
- › Pipetas Pasteur.
- › Desecadores.
- › Viales de vidrio de 1, 5, 10 y 20 mL.
- › Tubos de ensayo.
- › Insertos de vidrio de 100 μL .
- › Filtros de PTFE (\varnothing 20 μm).
- › Papel indicador pH 1 -10 [Merck].
- › Teflón.
- › Adaptadores y tuberías de plástico.
- › Soportes.

- › Nuez y pinza de laboratorio.

2.1.3. Patrones, disolventes y gases.

- › Patrón de hidrocarburos alifáticos. DRH-FTRPH-SET: disolución de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ en hexano de *n*-alcanos comprendidos entre octano y el tetracontano, más fitano y pristano [Sigma Aldrich].
- › Patrón de hidrocarburos aromáticos. PAH-Mix9: disolución de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ en ciclohexano [Dr. Ehrenstorfer GMBH].
- › Patrón TPH Mix 3: disolución de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ en sulfuro de carbono [Supelco].
- › Material de referencia certificado, CRM357-100 gramos. TPH – Sandy loam 2, lote JF357 [RTC].
- › Material de referencia certificado, CRM359-100 gramos. TPH – Clay loam 1, lote 015649 [RTC].
- › Material de referencia certificado, CRM372-100 gramos. TPH – Sand 1, lote 014092 [RTC].
- › Material de referencia certificado, PE1800 - 2 mL: TPH: $68,70 \mu\text{g mL}^{-1}$ en agua. Lote 018773 [RTC].
- › Material de referencia certificado, PE1799 - 2 mL: TPH en agua (Baja concentración) [RTC]. Lote LRAA0792.
- › Material de referencia certificado, PE1619 - 2 mL: TPH en agua (Alta concentración) [RTC]. Lote LRAA0793.
- › Acetona, hexano, diclorometano y metanol de calidad cromatográfica [Aldrich].
- › Agua desionizada.
- › Ácido clorhídrico fumante 37 % [Merck].
- › Sulfato de sodio anhidro [Merck].
- › Gel de sílice como agente desecante.
- › Gas helio (N50 / B50) como gas portador, gas hidrógeno (N50 / B50) como gas de combustión, gas aire (N50 / B50) como gas de mezcla y gas nitrógeno (N50 / B50) como gas “make up” y para la concentración de los extractos.

2.2. Preparación de patrones y reactivos.

A partir del patrón comercial de hidrocarburos alifáticos de $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se preparan por triplicado las disoluciones de calibrado. Los volúmenes empleados están recogidos en la Tabla I.

Tabla I: Disoluciones de calibrado de los hidrocarburos alifáticos.

Disolución	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Patrón (impar) $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (μL)	Patrón (par) $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (μL)	Volumen hexano (μL)
1	200	40	40	20
2	150	30	30	40
3	100	20	20	60
4	50	10	10	80
5	25		25*	75
6	5		5*	95

* Patrón $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

A partir del patrón comercial de PAHs de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se preparan por triplicado las disoluciones de calibrado. Los volúmenes empleados están recogidos en la Tabla II.

Tabla II: Disoluciones de calibrado de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Disolución	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Patrón $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (μL)	Volumen hexano (μL)
1	100	100	-
2	80	80	20
3	60	60	40
4	40	40	60
5	20	20	80
6	1	5*	95

* Patrón $20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

2.3. Procedimientos de limpieza.

Todo el material de laboratorio empleado en este procedimiento debe ser lavado y acondicionado con disolventes orgánicos antes de su empleo.

Debido a las características físico-químicas de la muestra, los hidrocarburos presentes en las muestras acuosas tienden a quedarse adsorbidos en las paredes de los recipientes de vidrio que los contienen. Por ello es necesario lavar todo este material con disolventes orgánicos. El material de vidrio que entre en contacto con la muestra acuosa debe ser lavado con acetona, que finalmente se añadirá a la muestra acuosa hasta obtener una mezcla de agua acetona al 10 %. A continuación, se lavará con 2 mL de hexano y 2 mL de diclorometano, que posteriormente será agregado a la muestra.

Las vasijas de extracción del sistema de microondas deben someterse a una etapa de lavado antes de su empleo. El lavado consiste en añadir 10 mL de acetona a cada recipiente de teflón y realizar el programa de limpieza (Tabla III). Una vez enfriados, se elimina el disolvente y se aclaran con acetona. Los recipientes deben conservarse cerrados hasta su empleo. Después de la extracción de la muestra, los recipientes de Teflón se dejarán sumergidos en agua con lejía durante 24 horas. A continuación se lavarán con agua y jabón.

Tabla III: Características del programa de limpieza del sistema de microondas.

Potencia (W)	Temperatura (°C)	Agitación (%)	QP limit (%)
650	110	50	50
Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de extracción (min)	Tiempo de enfriamiento (min)	
5	10	10	

2.4. Tratamiento de la muestra.

La Figura I presenta los esquemas de los procedimientos analíticos necesarios para analizar el contenido de TPH y los rangos de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en muestras de agua y suelo.

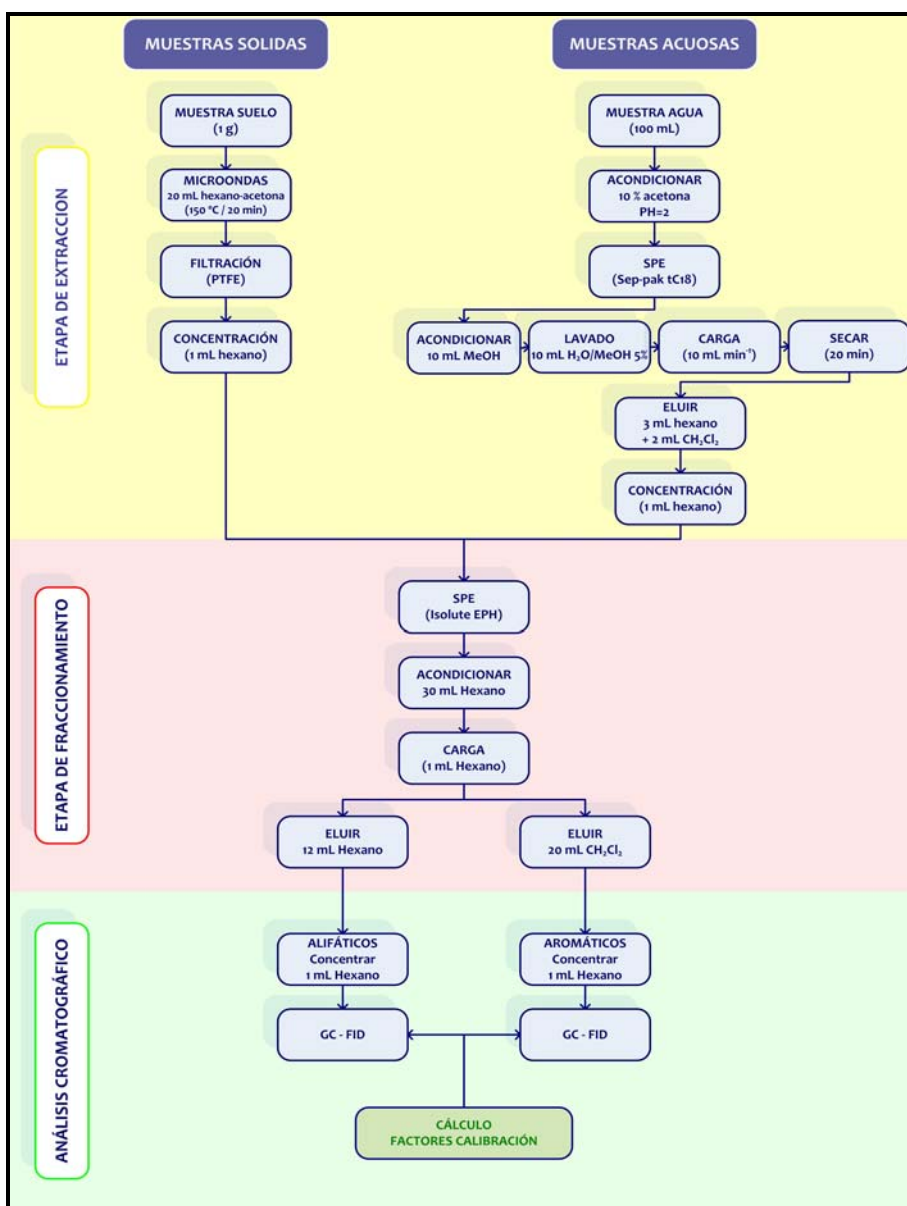


Figura I: Esquema del procedimiento analítico para determinar las fracciones de hidrocarburos y el contenido de TPH en muestras de agua y suelo.

2.4.1. Muestras de suelo.

2.4.1.1. Extracción con microondas.

Se pesa 1 gramo del suelo en una balanza analítica y se introduce en los reactores de Teflón. Se añade el agitador y se adicionan 20 mL de la mezcla hexano/acetona (1:1). Los reactores de Teflón se cierran y se comienza la extracción. Las condiciones experimentales están recogidas en la Tabla IV.

Tabla IV: Características del programa de extracción del sistema de microondas.

Potencia (W)	Temperatura (°C)	Agitación (%)	QP limit (%)
1 000	150	60	50
Tiempo de calentamiento (min)	Tiempo de extracción (min)	Tiempo de enfriamiento (min)	
10	20	10	

Una vez la muestra está fría (aproximadamente 45 minutos) se procede a concentrar los extractos con una ligera corriente de nitrógeno hasta obtener 1 mL. El extracto obtenido debe filtrarse para eliminar el material en suspensión. Se emplean filtros de PTFE de 20 µm de diámetro de poro.

2.4.1.2. Extracción en fase sólida (SPE) para muestras de suelo.

Los cartuchos Isolute (25 mL / 5 g) deben activarse antes de su empleo, y para ello se hacen pasar 30 mL de hexano. A continuación, y sin dejar secar el adsorbente, comienza la etapa de carga de la muestra. Ésta consiste en depositar la muestra, disuelta en 1 mL de hexano, en la parte superior del lecho. Por gravedad la muestra se introduce en el cartucho.

La etapa de elución consiste en añadir 12 mL de hexano. Este disolvente pasa a través del cartucho y se recogen en un vial marcado como fracción alifática. El volumen de hexano es crítico, ya que un exceso de hexano puede producir la elución de los compuestos aromáticos. Una vez recogida la primera fracción y sin que se haya secado el lecho del cartucho, se añaden 20 mL de diclorometano, que se recogen en un vial marcado como fracción aromática.

La SPE se realiza sin necesidad de aplicar presión. Por gravedad los disolventes pasan a través del cartucho, a una velocidad de 2-3 mL min⁻¹. En la Figura II se presenta el esquema del procedimiento de extracción en fase sólida.

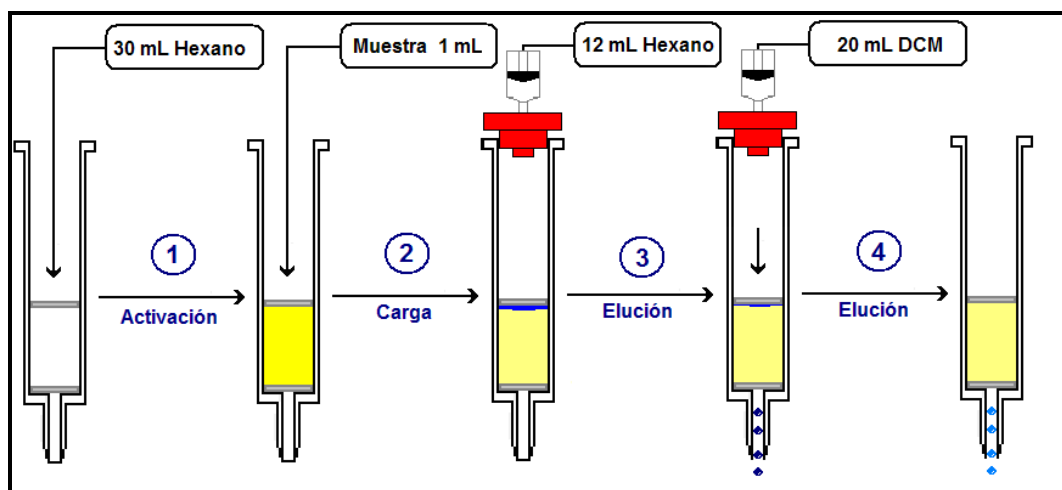


Figura II: Esquema de la SPE de los cartuchos Isolute EPH.

Las dos fracciones recogidas se concentran con nitrógeno hasta 1 mL y se procede a su inyección en el GC/FID. La primera fracción contiene los hidrocarburos alifáticos, mientras que la segunda fracción incluye los compuestos aromáticos.

2.4.2. Muestras de agua.

2.4.2.1. Acondicionamiento de la muestra acuosa.

Se procede a tomar 100 mL de la muestra de agua con una pipeta, que se deposita sobre un recipiente limpio. Se mide el pH de la muestra para comprobar su acidez (En origen la muestra ha sido acidificada con 5 mL de ácido sulfúrico). Si la muestra no tiene carácter ácido, debe acidificarse para evitar que los hidrocarburos se adsorban sobre las superficies de vidrio. Para ello se adiciona ácido clorhídrico fumante hasta obtener aproximadamente un pH=2 - 3.

La muestra acuosa debe acondicionarse para que pueda realizarse el proceso de extracción en fase sólida. Este acondicionamiento consiste en añadir un disolvente orgánico con lo que se modifica la polaridad de la matriz y se favorece la disolución de los hidrocarburos presentes. Para ello se debe añadir 10 mL de acetona.

Por último, se deja reposar la mezcla para conseguir la completa homogeneización de ésta.

2.4.2.2. Extracción en fase sólida (SPE) para muestras acuosas.

Los cartuchos de SPE deben activarse antes de su empleo. Para los cartuchos de fase inversa, como los Waters sep pak tC18 (6 mL / 1g), la etapa de activación consiste en hacer pasar un disolvente orgánico fuerte. Se debe pasar como mínimo 2-4 veces el

volumen del lecho. Para los cartuchos empleados, se ha comprobado que 10 mL de MeOH son suficientes para empapar completamente el adsorbente. Una vez activado, se debe proceder a equilibrar del cartucho y para ello se hacen pasar 10 mL de la mezcla agua/MeOH al 5 %. Para activar y equilibrar los cartuchos se aplica vacío (presión 150 – 200 mmHg).

A continuación, y sin dejar secar el adsorbente, comienza la etapa de carga de la muestra. En la parte superior del cartucho se acopla un adaptador y una tubería que se introduce en la muestra. Se conecta la bomba de vacío y comienza a pasar la muestra a un caudal constante de 5 mL min⁻¹.

La cuarta etapa consiste en secar el adsorbente. Esta etapa es fundamental para mejorar el rendimiento de la extracción. Para ello se hace pasar aire durante 20 minutos. Este tiempo es suficiente para eliminar completamente el agua retenida en el adsorbente sin producir pérdidas de los compuestos más volátiles.

La última etapa consiste en eluir la muestra retenida. Para ello se hace pasar un disolvente apolar por el cartucho. El empleo de 3 mL de hexano y 2 mL de diclorometano son suficientes para eluir completamente los hidrocarburos retenidos en el adsorbente. Se aplica una ligera presión para obtener un caudal de 1 mL min⁻¹.

En la Figura III se presenta el esquema del procedimiento de extracción en fase sólida.

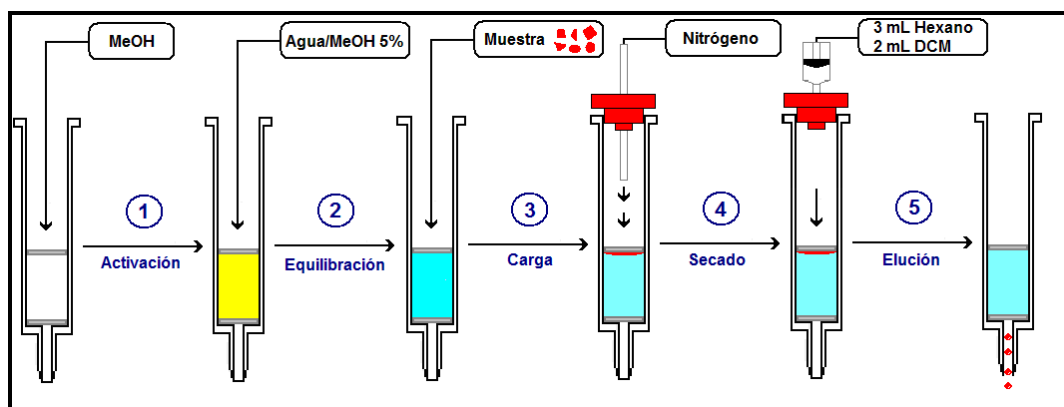


Figura III: Esquema de la SPE de los cartuchos Waters Sep pak tC18.

Para evitar las trazas de agua es necesario añadir sulfato de sodio anhidro al eluato. Finalmente, éste se concentra con nitrógeno hasta 1 mL de hexano y se procede a su fraccionamiento siguiendo el punto 2.4.1.2.

2.5. Análisis cromatográfico.

De acuerdo a la Figura I, tanto las muestras líquidas como las sólidas han sido tratadas para disponer los hidrocarburos en un medio apolar, como es una disolución con un volumen de 1 mL de hexano, por lo que la última etapa del procedimiento analítico, el análisis cromatográfico, es similar para ambas fracciones.

2.5.1. Condiciones de operación.

Para el análisis de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos se definen las condiciones óptimas de operación. En la Tabla V se presentan las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de estos compuestos.

Tabla V: Condiciones óptimas de operación para el análisis de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

Inyector	Horno	Detector
Liner: Agilent 5062-3587	Columna: HP5 (30 x 0,32 x 0,25)	Temperatura: 325 °C
Inyección: Splitless	Flujo: 2 mL min ⁻¹	Frecuencia: 20 Hz
Condiciones	Programa temperatura	Relación gases
T: 250 °C	(1) 80 °C 0 min.	H ₂ : 30 mL min ⁻¹
P: 10.744 psi	(2) 7 °C min ⁻¹ 200 °C 0 min.	Aire: 400 mL min ⁻¹
V: 3 µL muestra + 0,2 µL	(3) 11 °C min ⁻¹ 300 °C 17 min.	N ₂ : 25 mL min ⁻¹

2.5.2. Identificación de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

La identificación de los compuestos se realiza a través de los tiempos de retención. Para establecer precisamente los tiempos de retención de cada compuesto se deben realizar varias inyecciones a lo largo de un periodo de 72 horas. Se define la ventana de tiempo de retención como el tiempo de retención promedio más menos tres veces la desviación estándar. Los tiempos de retención para los compuestos estudiados en el momento de la redacción de este informe están recogidos en las Tablas VI y VII.

Tabla VI: Tiempos de retención de los hidrocarburos alifáticos [t_R promedio \pm 3s].

Compuesto	t_R (min)	Compuesto	t_R (min)	Compuesto	t_R (min)
Undecano	4,654 \pm 0,017	Eicosano	18,554 \pm 0,037	Hentriacontano	27,085 \pm 0,041
Dodecano	6,166 \pm 0,023	Heneicosano	19,652 \pm 0,034	Dotriacontano	27,828 \pm 0,047
Tridecano	7,828 \pm 0,030	Docosano	20,633 \pm 0,033	Tritriacontano	28,680 \pm 0,058
Tetradecano	9,527 \pm 0,031	Tricosano	21,524 \pm 0,030	Tetratriacontano	29,677 \pm 0,059
Pentadecano	11,202 \pm 0,036	Tetracosano	22,347 \pm 0,032	Pentatriacontano	30,855 \pm 0,081
Hexadecano	12,824 \pm 0,038	Pentacosano	23,114 \pm 0,031	Hexatriacontano	32,260 \pm 0,097
Heptadecano	14,380 \pm 0,043	Hexacosano	23,840 \pm 0,033	Heptatriacontano	33,939 \pm 0,098
Pristano	14,480 \pm 0,044	Heptacosano	24,529 \pm 0,031	Octatriacontano	35,962 \pm 0,103
Octadecano	15,869 \pm 0,044	Octacosano	25,186 \pm 0,032	Nonatricoantano	38,402 \pm 0,124
Fitano	16,011 \pm 0,047	Nonacosano	25,817 \pm 0,032	Tetracontano	41,358 \pm 0,154
Nonadecano	17,290 \pm 0,043	Triacotano	26,428 \pm 0,034		

Tabla VII: Tiempos de retención de hidrocarburos aromáticos [t_R promedio \pm 3s].

Compuesto	t_R (min)	Compuesto	t_R (min)	Compuesto	t_R (min)
Naftaleno	6,076 \pm 0,118	Fluoranteno	19,342 \pm 0,105	B(a)Py	25,816 \pm 0,132
Acenaftileno	10,476 \pm 0,089	Pireno	19,908 \pm 0,111	InPy	27,814 \pm 0,361
Acenafteno	11,067 \pm 0,097	B(a)A	22,790 \pm 0,339	DBA	28,112 \pm 0,239
Fluoreno	12,657 \pm 0,101	Criseno	22,967 \pm 0,095	B(ghi)Pe	28,496 \pm 0,362
Fenantreno	15,627 \pm 0,309	B(b)F	25,061 \pm 0,281		
Antraceno	15,803 \pm 0,163	B(k)F	25,234 \pm 0,058		

2.5.3. Definición de los rangos de hidrocarburos.

Se definen los rangos de hidrocarburos alifáticos en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática. En la Tabla VIII se definen los 5 rangos de hidrocarburos alifáticos. Cada rango comienza 0,1 minutos antes de la elución del primer hidrocarburo del rango y termina 0,1 antes de la elución del primer hidrocarburo de siguiente rango.

Tabla VIII: Definición de los rangos de hidrocarburos alifáticos.

Rango hidrocarburos alifáticos	Tiempo de inicio (min)	Tiempo de finalización (min)
$>C_{10} - C_{12}$	4,2	7,0
$>C_{12} - C_{16}$	7,0	13,5
$>C_{16} - C_{21}$	13,5	20,2
$>C_{21} - C_{35}$	20,2	31,0
$>C_{35}$	31,0	43,23

Para definir los rangos de hidrocarburos aromáticos se emplea el número equivalente de carbono. En la Tabla IX se presentan los resultados para los hidrocarburos aromáticos.

Tabla IX: Número equivalente de carbono (EC) de los hidrocarburos aromáticos.

PAHs	P.E. (°C)*	Nº Carbonos	EC	PAHs	P.E. (°C)*	Nº Carbonos	EC
Naftaleno	218	10	11,69	B(a)A	435	18	26,37
Acenaftileno	270	12	15,06	Criseno	448	18	27,41
Acenafteno	277,5	12	15,50	B(b)F	481	20	30,14
Fluoreno	295	13	16,55	B(k)F	481	20	30,14
Fenantreno	339	14	19,36	B(a)Py	495	20	31,34
Antraceno	340	14	19,43	InPy	536	22	35,01
Fluoranteno	375	16	21,85	DBA	524	22	33,92
Pireno	360	16	20,80	B(ghi)Pe	525	22	34,01

* P.E: Punto de ebullición.

Los rangos de hidrocarburos aromáticos definidos en función del EC están recogidos en la Tabla X. Al igual que los hidrocarburos alifáticos, cada rango comienza 0,1 minutos antes de la elución del primer PAHs del rango y termina 0,1 antes de la elución del primer PAHs de siguiente rango.

Tabla X: Definición de los rangos de hidrocarburos aromáticos.

Rango hidrocarburos aromáticos	Tiempo de inicio (min)	Tiempo de finalización (min)
>EC ₁₀ - EC ₁₂	4,0	6,5
>EC ₁₂ - EC ₁₆	6,5	12,5
>EC ₁₆ - EC ₂₁	12,5	20,0
>EC ₁₆ - EC ₃₅	20,0	27,0
>EC ₃₅	27,0	42,23

2.5.4. Cuantificación de los rangos de hidrocarburos.

La cuantificación de los rangos definidos se realiza utilizando factores de calibración. Esta técnica de calibración es la recomendada para determinar la relación entre la respuesta del detector FID y la concentración de las especies analizadas.

2.5.4.1. Factores de calibración para los hidrocarburos alifáticos.

Se preparan 6 disoluciones de hidrocarburos alifáticos, según el punto 2.2 de este informe, y se analizan todas las disoluciones de calibración de acuerdo al punto 2.5.1. La disolución de concentración más baja y la disolución de concentración más elevada definen el intervalo de trabajo.

La expresión para calcular los factores de calibración de los 5 rangos de hidrocarburos alifáticos se muestra en la Eq. (1):

$$FC (Rango) = \frac{\sum_{i=1}^{n=peak} A}{C_T} \quad \text{Eq. (1)}$$

Donde A es el área del pico cromatográfico y C_T es la concentración total inyectada en cada rango. Esta no es igual en todos los rangos ya que cada uno de ellos incluye un número diferente de compuestos. En la Tabla XI se resumen las concentraciones inyectadas en los diferentes rangos para cada disolución de calibración.

Tabla XI: Concentraciones de los hidrocarburos alifáticos inyectados en cada rango.

Rango	n	Concentración total de hidrocarburos inyectada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
		1	2	3	4	5	6
> C_{10} - C_{12}	2	400	300	200	100	50	10
> C_{12} - C_{16}	4	1800	600	400	200	00	20
> C_{16} - C_{21}	7	1400	1050	700	350	175	35
> C_{21} - C_{35}	14	2800	2100	1400	700	350	70
> C_{35}	5	1000	750	500	250	125	25

El tipo de integración que se realiza es a “línea base”. El factor de calibración se calcula como la media de los factores de calibración obtenidos en las 6 disoluciones inyectadas. Los resultados obtenidos están recogidos en la Tabla XII.

Tabla XII: Factores de calibración de los rangos de hidrocarburos alifáticos.

Rango hidrocarburos alifáticos	FC ($\text{pA s mL } \mu\text{g}^{-1}$)	RDS (%)
> C_{10} - C_{12}	537812	7
> C_{12} - C_{16}	522472	6
> C_{16} - C_{21}	502038	10
> C_{21} - C_{35}	536472	12
> C_{35}	494263	17

La Figura IV muestra el cromatograma de un patrón de hidrocarburos alifáticos de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

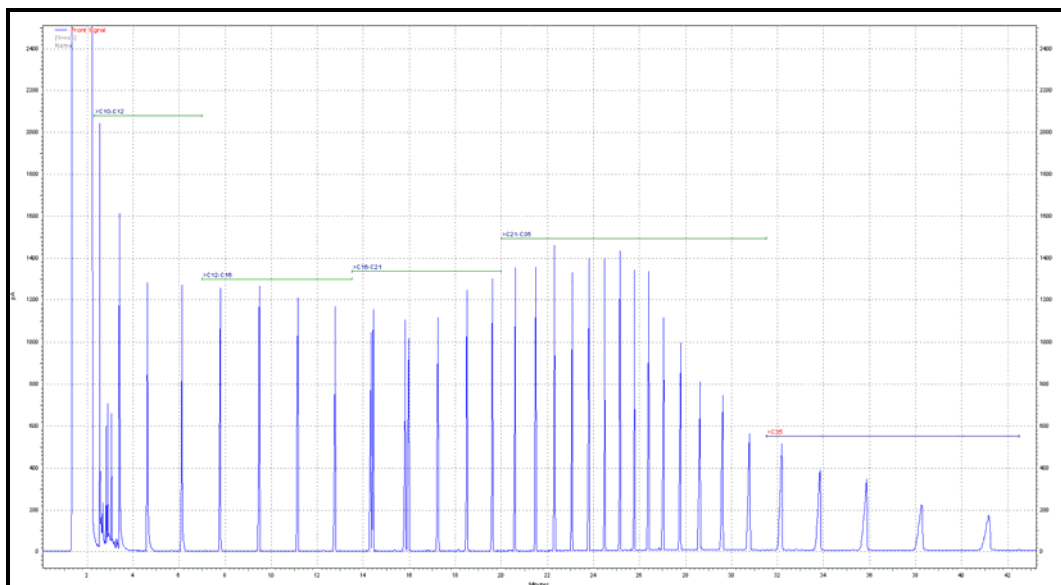


Figura IV: Cromatograma de un patrón de hidrocarburos alifáticos de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.5.4.2. Factores de calibración para los hidrocarburos aromáticos.

Se preparan las 6 disoluciones de hidrocarburos aromáticos descritas en el punto 2.2. El intervalo de trabajo queda definido por la disolución de concentración más baja y la disolución de concentración más elevada.

La ecuación 1 recoge la expresión para calcular los factores de calibración de los 5 rangos de hidrocarburos aromáticos, mientras que en la Tabla XIII se resumen las concentraciones inyectadas en los diferentes rangos.

Tabla XIII: Concentraciones de hidrocarburos aromáticos inyectados en cada rango.

Rango	n	Concentración total inyectada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
		1	2	3	4	5	6
>EC ₁₀ - EC ₁₂	1	100	80	60	40	20	1
>EC ₁₂ - EC ₁₆	2	200	160	120	80	40	2
>EC ₁₆ - EC ₂₁	5	500	400	300	200	100	5
>EC ₂₁ - EC ₃₅	5	500	400	300	200	100	5
>EC ₃₅	3	300	240	180	120	60	3

La integración que se realiza es a “línea base”. El factor de calibración se calcula como la media de los factores de calibración obtenidos en las 6 disoluciones inyectadas. Los resultados obtenidos están recogidos en la Tabla XIV.

Tabla XIV: Factores de calibración de los rangos de hidrocarburos aromáticos.

Rango hidrocarburos aromáticos	FC (pA s mL µg ⁻¹)	RDS (%)
>EC ₁₀ - EC ₁₂	586361	6
>EC ₁₂ - EC ₁₆	580012	5
>EC ₁₆ - EC ₂₁	559915	5
>EC ₂₁ - EC ₃₅	547233	7
>EC ₃₅	372386	4

La Figura V muestra el cromatograma de un patrón de hidrocarburos aromáticos de 60 µg mL⁻¹.

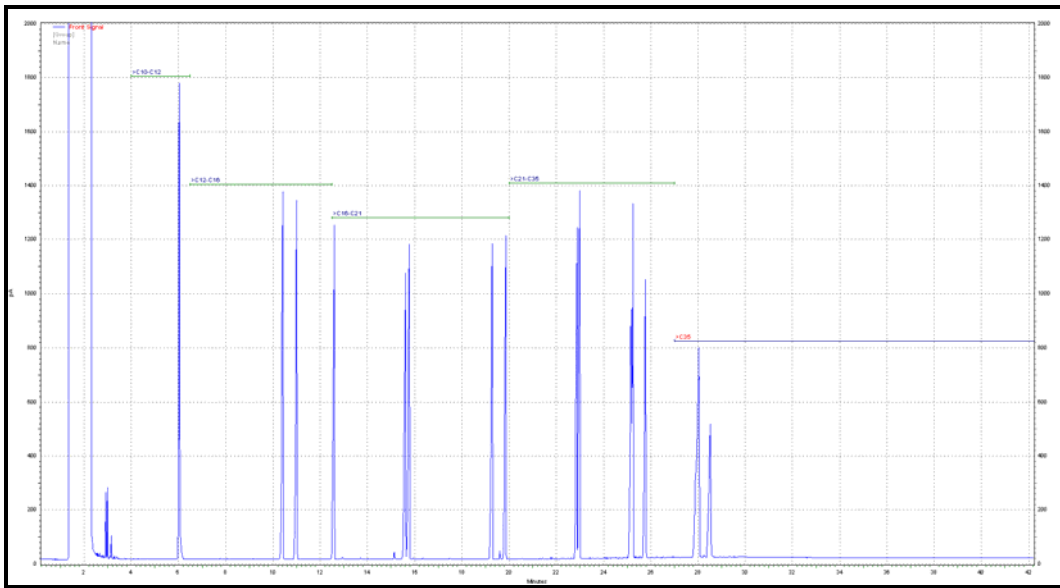


Figura V: Cromatograma de un patrón de hidrocarburos aromáticos de 60 µg mL⁻¹.

2.5.5. Cálculo de las concentraciones en muestras sólidas y líquidas.

La identificación cuantitativa de los rangos de hidrocarburos en las muestras se realiza a partir del área cromatográfica y los factores de calibración según la Eq. (2):

$$C_{Rango} = \frac{A}{FC} \quad \text{Eq. (2)}$$

La concentración de los rangos de hidrocarburos en muestras sólidas se proporcióna con una cifra decimal como mg Kg⁻¹, de acuerdo a la ecuación 3, mientras que el contenido en muestras acuosas se proporcióna con una cifra decimal como mg L⁻¹, de acuerdo a la ecuación 4.

$$C_{HC} (mg \cdot Kg^{-1}) = \frac{C_R \times V_F \times 10^3}{m} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$C_{HC} (mg \cdot L^{-1}) = \frac{C_R \times V_F \times 10^{-3}}{V_a} \quad \text{Eq. (4)}$$

Donde V_f es el volumen (expresado en mL) en el que se disuelve la muestra para ser inyectada en el GC/FID, m es el peso (expresado en Kilogramos) de sedimento analizado y V_a es el volumen (expresado Litros) de agua analizada.

Las muestras deben ser analizadas por triplicado y presentar los resultados con un intervalo de confianza. Asumiendo una distribución normal y un nivel de confianza del 95 %, el intervalo de confianza se calcula de acuerdo a la ecuación 5:

$$\text{Intervalo confianza} = \pm 1,96 \times \frac{S}{\sqrt{n}} \quad \text{Eq. (5)}$$

3. RESULTADOS.

3.1. Validación de la metodología.

El estudio de validación de las dos metodologías desarrolladas ha sido drealizado de acuerdo a la guía publicada por la EuraChem [28]. Concretamente, en este informe se han establecido los siguientes parámetros: linealidad, sesgo, exactitud, trazabilidad, precisión intermedia, repetibilidad, límite de detección y límite de cuantificación.

3.1.1. Linealidad.

La linealidad ha sido evaluada mediante el uso de los factores de calibración, los cuales determinan la relación entre la señal del detector y la concentración de analito inyectada. De acuerdo a la Figura 1 de este informe, la etapa de análisis para el método de análisis para muestras líquidas y sólidas es idéntico, por lo que solamente se realizará un cálculo para este parámetro.

Para determinar la linealidad de ambos métodos, se ha inyectado por triplicado, seis disoluciones de hidrocarburos alifáticos y seis disoluciones de hidrocarburos aromáticos a diferentes concentraciones. Los factores de calibración son calculados como la relación entre el área del pico cromatográfico y la concentración inyectada. En la Tabla XV se presentan los factores de calibración obtenidos, así como la desviación estándar relativa. La concentración más baja y la concentración más alta definen el intervalo de trabajo donde la señal del detector es lineal.

Tabla XV: Linealidad para el análisis de hidrocarburos en muestras líquidas y sólidas.

Rango	Inicio linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fin linealidad ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	FC ($\text{pA s mL } \mu\text{g}^{-1}$)	RDS (%)
Alifáticos				
> C_{10} – C_{12}	10	400	537812	7
> C_{12} – C_{16}	20	1800	522472	6
> C_{16} – C_{21}	35	2400	502038	10
> C_{21} – C_{35}	70	2800	536472	12
> C_{35}	25	1000	494263	17
Aromáticos				
> EC_{10} – EC_{12}	1	100	586361	6
> EC_{12} – EC_{16}	2	200	580012	5
> EC_{16} – EC_{21}	5	500	559915	5
> EC_{21} – EC_{35}	5	500	547233	7
> EC_{35}	3	300	372386	4
TPH	160	6400	365901	3

3.1.2. Sesgo.

La evaluación del sesgo de una metodología permite establecer la exactitud de éste. El sesgo del procedimiento se ha calculado a través de un experimento de recuperación de varios materiales de referencia. Concretamente se ha empleado el material de referencia CRM372 para determinar la recuperación del método de análisis para las muestras sólidas, y los materiales de referencia PE1799 y PE1619 para el método de análisis de las muestras líquidas. Las materiales de referencia son analizadas de acuerdo a los procedimientos desarrollados. Se realizan un total de ocho análisis para cada material de referencia. Los resultados obtenidos para el método de análisis para las muestras líquidas están resumidos en la Tabla XVI, mientras que para las muestras sólidas están recogidos en la Tabla XVII.

Tabla XVI: Estudio de la exactitud del procedimiento de análisis de hidrocarburos en muestras líquidas.

Rango	Concentración (mg L ⁻¹)	PE-1619		PE-1779		
		Recuperación (%)	RDS (%)	Concentración (mg L ⁻¹)	Recuperación (%)	RDS (%)
Alifáticos						
>C ₁₀ – C ₁₂	5,3 ± 0,8	67	9	0,5 ± 0,03	102	4
>C ₁₂ – C ₁₆	11,9 ± 2,3	78	12	1,5 ± 0,3	84	13
>C ₁₆ – C ₂₁	7,6 ± 1,5	74	13	1,5 ± 0,1	124	5
>C ₂₁ – C ₃₅	3,4 ± 0,4	84	7	0,7 ± 0,1	> 150	5
Aromáticos						
>EC ₁₀ – EC ₁₂	3,8 ± 1,4	45	31	0,4 ± 0,3	56	56
>EC ₁₂ – EC ₁₆	7,4 ± 2,1	49	22	1,2 ± 0,2	64	37
>EC ₁₆ – EC ₂₁	8,4 ± 2,0	81	18	0,9 ± 0,5	97	10
>EC ₂₁ – EC ₃₅	1,5 ± 0,1	20	3	0,5 ± 0,1	> 150	8
TPH	64 ± 12,8	85	13	13,6 ± 7,4	82	34

El análisis de los dos materiales de referencia ha permitido establecer la viabilidad del procedimiento en dos niveles de concentración. El análisis del TPH ha presentado valores de recuperación superiores al 80 %. Los valores de desviación típica relativa han confirmado que el análisis a niveles de concentración más bajos presenta una mayor dispersión. Los valores obtenidos están dentro de los límites que certifican los materiales de referencia, 20 % para el material PE-1619 (elevada concentración) y de un 30 % para el PE-1779 (baja concentración).

Las recuperaciones obtenidas para el análisis de los rangos de hidrocarburos alifáticos han presentados valores en torno al 80 %, tanto a alta como a baja concentración. Únicamente cabe destacar las recuperaciones obtenidas para los rangos > C₁₆- C₂₁ y > C₂₁ -C₃₅ en el material PE-1779. Estas recuperaciones se han atribuido a que la señal medida era similar a la señal de los blancos y por tanto estas áreas estaban próximas a los límites de

cuantificación instrumental. En cuanto a la desviación estándar relativa no se han presentado diferencias significativas entre los dos materiales estudiados, siendo los valores obtenidos, en torno al 10 %, inferiores a los establecidos para cada uno de los materiales de referencia.

En el caso de las recuperaciones obtenidas por los rangos de hidrocarburos aromáticos, vemos que los resultados han sido menores, en torno al 50 % en alguno de los rangos. Estos valores, a pesar de ser bajos, están dentro de los límites aceptados por cada uno de los materiales de referencia. Los autores han atribuido esta menor recuperación al incompleto fraccionamiento de la segunda SPE, ya que parte de los compuestos aromáticos han sido co-eluidos junto a los compuestos alifáticos. Además, esto se ha traducido en una mayor desviación estándar relativa que los compuestos alifáticos.

Tabla XVII: Estudio de la exactitud del procedimiento de análisis de hidrocarburos en muestras sólidas.

Rango	Concentración (mg Kg ⁻¹)	Recuperación (%)	CRM ₃₇₂ RDS (%)
Alifáticos			
>C ₁₀ – C ₁₂	72,7 ± 4,0	102	8
>C ₁₂ – C ₁₆	288,6 ± 19,7	92	10
>C ₁₆ – C ₂₁	191,9 ± 6,7	92	5
>C ₂₁ – C ₃₅	558,0 ± 16,2	121	4
Aromáticos			
>EC ₁₀ – EC ₁₂	26,8 ± 4,3	157	23
>EC ₁₂ – EC ₁₆	113,3 ± 19,4	101	25
>EC ₁₆ – EC ₂₁	96,1 ± 8,1	100	12
>EC ₂₁ – EC ₃₅	40,4 ± 7,8	103	28
TPH	2042 ± 295	101	21

Los resultados obtenidos para las 8 alícuotas del material de referencia de hidrocarburos en suelos han presentado recuperaciones superiores al 90 % en todos los rangos estudiados. Estos resultados confirman que el procedimiento desarrollado es efectivo para extraer y fraccionar los rangos de hidrocarburos contenidos en muestras de suelos.

La elevada recuperación obtenida para el primer rango de hidrocarburos aromáticos se debe a los blancos obtenidos en algunas muestras. Se ha comprobado que los blancos elevados se deben a algunas de las vasijas del microondas, por lo que se debe tener en cuenta la vasija en la que se realiza el análisis a la hora de presentar un resultado. Estos resultados hacen hincapié en la necesidad de realizar el procedimiento de limpieza de las vasijas del microondas antes y después de cada análisis.

Por otro lado, hay que señalar la recuperación obtenida para el último rango de hidrocarburos alifáticos, que es atribuida a una mayor dispersión en el factor de calibración para este rango. Debido al propio análisis cromatográfico, los picos resueltos en esta zona del calibrado empiezan a ser más anchos y bajos, por lo que existe una mayor variabilidad en la integración. Esta variabilidad va aumentando conforme se realizan inyecciones, por lo que el FC calculado para este rango cambia ligeramente con el número de inyecciones. Por esta razón el FC de este rango debe ser revisado periódicamente. Para el resto de rangos no se ha observado esta variación del FC con el tiempo.

Si observamos la desviación estándar relativa, se observa que en el análisis de los hidrocarburos alifáticos es inferior al 10 %, mientras que para los hidrocarburos aromáticos es superior al 20 %. Esto está en concordancia con los valores certificados del material de referencia donde los intervalos de confianza de los hidrocarburos aromáticos son mucho mayores a los de los hidrocarburos alifáticos.

3.1.3. Trazabilidad.

La trazabilidad se establece empleando materiales de referencia certificada. Para el análisis de hidrocarburos en muestras líquidas se han empleado dos materiales de referencia certificada: el material PE-1799 certifica el contenido de varias cadenas de hidrocarburos a baja concentración en agua y el material PE-1619 certifica el contenido de hidrocarburos a elevada concentración en aguas. Los resultados obtenidos para el análisis de estos materiales están recogidos en la Tabla XVIII.

Tabla XVIII: Establecimiento de la trazabilidad del método de análisis de hidrocarburos en agua mediante el análisis de dos materiales de referencia certificada.

Rango	Concentración PE-1799 (mg L ⁻¹)		Concentración PE-1619 (mg L ⁻¹)			
	Valor certificado	Límites aceptados	Valor medido	Valor certificado	Límites aceptados	Valor medido
Alifáticos						
>C ₁₀ – C ₁₂	0,45 ± 0,037	0,18 – 0,72	0,5 ± 0,03	7,93 ± 1,45	3,17 – 12,7	5,3 ± 0,8
>C ₁₂ – C ₁₆	1,82 ± 0,098	0,73 – 2,91	1,5 ± 0,3	15,2 ± 2,97	6,08 – 24,3	11,9 ± 2,3
>C ₁₆ – C ₂₁	1,21 ± 0,093	0,48 – 1,94	1,5 ± 0,1	10,2 ± 2,09	4,08 – 16,3	7,6 ± 1,5
>C ₂₁ – C ₃₅	0,3 ± 0,070	0,12 – 0,48	0,7 ± 0,1	4,0 ± 0,55	0,40 – 9,40	3,4 ± 0,4
Aromáticos						
>EC ₁₀ – EC ₁₂	0,58 ± 0,06	0,23 – 0,93	0,4 ± 0,3	8,31 ± 1,88	3,32 – 13,3	3,8 ± 1,4
>EC ₁₂ – EC ₁₆	1,83 ± 0,178	0,73 – 2,93	1,2 ± 0,2	15,3 ± 2,38	6,12 – 24,5	7,4 ± 2,1
>EC ₁₆ – EC ₂₁	0,92 ± 0,081	0,37 – 1,47	0,9 ± 0,5	10,3 ± 2,04	4,12 – 16,5	8,4 ± 2,0
>EC ₂₁ – EC ₃₅	0,25 ± 0,007	0,10 – 0,4	0,5 ± 0,1	6,69 ± 0,70	2,68 – 10,7	1,5 ± 0,1
TPH	16,5 ± 1,21	6,60 – 26,4	13,6 ± 7,4	75,7 ± 2,97	30,3 – 121	64 ± 12,8

Se han analizado 8 alícuotas de los dos materiales de referencia y los valores obtenidos están dentro los límites aceptados por cada uno de los materiales de referencia. Estos resultados han demostrado la trazabilidad del procedimiento analítico. Solamente, el rango de compuestos aromáticos >EC₂₁ – EC₃₅ ha presentado valores fuera de los intervalos aceptados, posiblemente debido a problemas en la etapa de fraccionamiento.

Para establecer la trazabilidad del método para determinar los rangos de hidrocarburos en muestras sólidas, se han empleado tres materiales de referencia certificada: el material CRM-357 certifica el contenido de TPH en un suelo arenoso, el material CRM-359 certifica el contenido de TPH en suelos arcillosos y el material CRM-372 certifica el contenido de varios rangos de hidrocarburos en muestras arenosas. Los resultados obtenidos están recogidos en la Tabla XIX.

Tabla XIX: Establecimiento de la trazabilidad del método de análisis de hidrocarburos en suelos mediante el análisis de tres materiales de referencia certificada.

Rango	Concentración CRM-357		Concentración CRM-359		Concentración CRM-372	
	Certificada (mg Kg ⁻¹)	Medida (mg Kg ⁻¹)	Certificada (mg Kg ⁻¹)	Medida (mg Kg ⁻¹)	Certificada (mg Kg ⁻¹)	Medida (mg Kg ⁻¹)
Alifáticos						
>C ₁₀ – C ₁₂	-	-	-	-	70,9 ± 5,88	72,7 ± 4,0
>C ₁₂ – C ₁₆	-	-	-	-	314 ± 6,25	288,6 ± 19,7
>C ₁₆ – C ₂₁	-	-	-	-	209 ± 14,0	191,9 ± 6,7
>C ₂₁ – C ₃₅	-	-	-	-	460 ± 8,17	558,0 ± 16,2
>C ₃₅	-	-	-	-	-	-
Aromáticos						
>EC ₁₀ – EC ₁₂	-	-	-	-	17,1 ± 7,52	26,8 ± 4,3
>EC ₁₂ – EC ₁₆	-	-	-	-	112 ± 40,7	113,3 ± 19,4
>EC ₁₆ – EC ₂₁	-	-	-	-	96,2 ± 15,2	96,1 ± 8,1
>EC ₂₁ – EC ₃₅	-	-	-	-	39,4 ± 7,21	40,4 ± 7,8
>EC ₃₅	-	-	-	-	-	-
TPH	3220 ± 310	2978 ± 63	1110 ± 110	1015 ± 123	2020 ± 163	2042 ± 295

Cada material de referencia ha sido analizado 8 veces. Se ha observado que los tres materiales de referencia analizados han presentado concentraciones dentro del rango certificado en cada caso, únicamente para el último rango de hidrocarburos alifáticos el valor presentado está en el límite del intervalo de confianza. Hay que destacar que la matriz de los materiales de referencia es diferente, en dos casos la matriz era un suelo arenoso y en el otro caso era un suelo arcilloso, por lo que se confirma que la matriz no afecta al análisis de estos compuestos mediante el procedimiento analítico desarrollado.

3.1.4. Precisión.

Para validar un procedimiento analítico existen diferentes medidas de la precisión, siendo las dos más importantes la repetibilidad y la precisión intermedia.

La repetibilidad se calcula como la desviación estándar relativa obtenida al inyectar consecutivamente 4 veces una muestra del material de referencia certificado. Por otro lado, la precisión intermedia se establece como la desviación estándar relativa obtenida al analizar en diferentes días una muestra de material certificado inyectada ocho veces.

Los resultados de repetibilidad y precisión intermedia del procedimiento de análisis de hidrocarburos en muestras acuosas están resumidos en la Tabla XX. Para el procedimiento de análisis de hidrocarburos en muestras de suelo, los resultados de repetibilidad y precisión intermedia están recogidos en la Tabla XXI.

Tabla XX: Repetibilidad y precisión intermedia del método de análisis de hidrocarburos en muestras líquidas.

Rango Hidrocarburos	Repetibilidad (n=4) RDS (%)	Precisión intermedia (n=8) RDS (%)
Alifáticos		
>C ₁₀ – C ₁₂	0,3	3
>C ₁₂ – C ₁₆	0,5	3
>C ₁₆ – C ₂₁	1	4
>C ₂₁ – C ₃₅	1	4
>C ₃₅	8	6
Aromáticos		
>EC ₁₀ – EC ₁₂	2	3
>EC ₁₂ – EC ₁₆	3	3
>EC ₁₆ – EC ₂₁	4	4
>EC ₂₁ – EC ₃₅	5	7
>EC ₃₅	5	6
TPH	0,7	3

Los rangos de hidrocarburos alifáticos han presentado una desviación estándar más baja que la obtenida por los rangos de hidrocarburos aromáticos, confirmando una mayor repetibilidad para el análisis de rangos de hidrocarburos alifáticos en agua. La precisión intermedia de los rangos de hidrocarburos alifáticos y aromáticos es similar, con valores próximos al 5 %.

Tabla XXI: Repetibilidad y precisión intermedia del método de análisis de hidrocarburos en muestras sólidas.

Rango Hidrocarburos	Repetibilidad (n=4) RDS (%)	Precisión intermedia (n=8) RDS (%)
Alifáticos		
>C ₁₀ – C ₁₂	0,4	1
>C ₁₂ – C ₁₆	0,3	1
>C ₁₆ – C ₂₁	0,6	0,8
>C ₂₁ – C ₃₅	0,4	1
>C ₃₅	2	3
Aromáticos		
>EC ₁₀ – EC ₁₂	3	3
>EC ₁₂ – EC ₁₆	2	4
>EC ₁₆ – EC ₂₁	2	4
>EC ₂₁ – EC ₃₅	1	4
>EC ₃₅	2	3
TPH	0,4	1,8

La repetibilidad y la precisión intermedia de los rangos de hidrocarburos alifáticos son ligeramente inferiores a las obtenidas por los hidrocarburos aromáticos. Se confirma que el análisis de los rangos de hidrocarburos alifáticos es más preciso y exacto que el análisis de los hidrocarburos aromáticos, lo que confirma que los materiales de referencia presentan intervalos de confianza más pequeños para los rangos de hidrocarburos alifáticos.

3.1.5. Límites de detección y cuantificación.

Los límites de detección y cuantificación son calculados mediante el empleo de blancos enriquecidos con hidrocarburos. De este modo, se han enriquecido seis blancos con hidrocarburos a un nivel de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se ha procedido a su análisis mediante cromatografía. El límite de detección instrumental fue calculado como tres veces la desviación estándar mientras que el límite de cuantificación se estableció como diez veces la desviación estándar del blanco enriquecido. La Tabla XXII establece los límites de detección para muestras líquidas y sólidas.

Tabla XXII: Determinación de los límites de detección y cuantificación de los hidrocarburos en muestras líquidas y sólidas.

Rango Hidrocarburos	Muestras líquidas		Muestras sólidas	
	Límite Detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Límite Cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Límite Detección (mg Kg^{-1})	Límite Cuantificación (mg Kg^{-1})
Alifáticos				
>C ₁₀ – C ₁₂	2	5	0,2	0,5
>C ₁₂ – C ₁₆	1	3	0,1	0,3
>C ₁₆ – C ₂₁	3	9	0,3	0,9
>C ₂₁ – C ₃₅	5	18	0,5	1,8
>C ₃₅	2	8	0,2	0,8
Aromáticos				
>EC ₁₀ – EC ₁₂	0,3	1	0,03	0,1
>EC ₁₂ – EC ₁₆	1	2	0,1	0,2
>EC ₁₆ – EC ₂₁	1	4	0,1	0,4
>EC ₂₁ – EC ₃₅	1	5	0,1	0,5
>EC ₃₅	2	6	0,2	0,6
TPH	18	60	1,2	4,0

Los resultados obtenidos han presentado límites de detección y cuantificación lo suficientemente bajos para poder cuantificar satisfactoriamente el nivel de hidrocarburos en muestras sólidas y líquidas.

3.2. Cálculo de la incertidumbre.

3.2.1. Incertidumbre en las muestras sólidas.

La concentración de los rangos de hidrocarburos en las muestras sólidas, expresada como mg Kg^{-1} , se obtiene a partir de la Eq. (6):

$$C_{HC} (\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}) = \frac{A \times V_F \times 10^3}{FC \times m \times R} \quad \text{Eq. (6)}$$

Dónde A se corresponde al área total del rango medido; V_F es el volumen de hexano en el que se diluye la muestra antes de ser inyectada (1 mL); FC es el factor de calibración del rango; m es el peso de la muestra analizada (1 gramo); R es la recuperación de cada rango.

Todas estas variables son potenciales fuentes de incertidumbre. El diagrama de causa y efecto, presentado en la Figura VI, facilita la identificación y cuantificación de cada fuente, impidiendo la estimación de una fuente por duplicado.

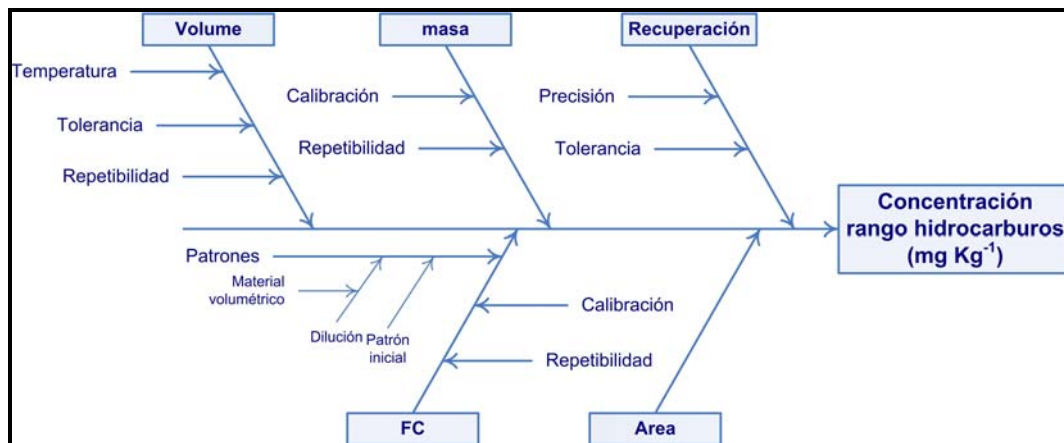


Figura VI: Diagrama de causa y efecto para evaluar la incertidumbre asociada a la determinación de hidrocarburos en muestras de suelo.

3.2.1.1. Incertidumbre asociada al área.

El sistema de adquisición de datos del cromatógrafo de gases muestra la señal registrada por el FID en picoamperios (pA), por lo que las áreas de los picos cromatográficos están medidas en pA s. De acuerdo a las especificaciones técnicas del dispositivo, el sistema tiene una resolución de 1 pA s, por lo que la incertidumbre asociada al área del pico cromatográfico se calcula asumiendo una distribución rectangular, de acuerdo a la Eq. (7):

$$u_R(\text{Area}) = \frac{u(\text{Area})}{\text{Area}} = \left(\frac{\text{resolución}/\sqrt{3}}{\text{Area}} \right) \quad \text{Eq. (7)}$$

Para calcular esta incertidumbre, se han empleado las áreas medias obtenidas en el estudio de precisión. Los resultados recogidos en la Tabla XXIII han demostrado que esta incertidumbre es muy baja y su contribución a la incertidumbre final es mínima, por lo que puede ser prescindible. Se debe a que las áreas medidas son mucho más elevadas que la resolución.

Tabla XXIII: Cálculo de la incertidumbre asociada al área cromatográfica.

Rango Hidrocarburos	$u(\text{Área})$ (pA s)	Área $\times 10^6$ (pA s)	$u_R(\text{Área})$ $\times 10^{-3}$
Alifáticos			
>C ₁₀ – C ₁₂	0,577	5,75	10,0
>C ₁₂ – C ₁₆	0,577	10,50	5,50
>C ₁₆ – C ₂₁	0,577	16,32	3,54
>C ₂₁ – C ₃₅	0,577	31,20	1,85
>C ₃₅	0,577	14,93	3,87
Aromáticos			
>EC ₁₀ – EC ₁₂	0,577	11,54	5,00
>EC ₁₂ – EC ₁₆	0,577	21,79	2,65
>EC ₁₆ – EC ₂₁	0,577	52,32	1,10
>EC ₂₁ – EC ₃₅	0,577	51,63	1,12
>EC ₃₅	0,577	29,57	1,95
TPH	0,577	78,7	0,733

3.2.1.2. Incertidumbre asociada al volumen final de muestra.

Para calcular la incertidumbre asociada al volumen en el que es disuelta la muestra antes de ser analizada, se han considerado tres contribuciones: influencia de la temperatura, tolerancia del material volumétrico y la repetibilidad. La Eq. (8) presenta las tres contribuciones.

$$u_R(\text{Volumen}) = \frac{u(\text{Volumen})}{\text{Volumen}} = \sqrt{\left(\frac{\text{Vol} \times \Delta T \times C_{EXP}}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(\frac{\text{División}/\sqrt{6}}{V}\right)^2 + \left(\frac{s}{m}\right)^2} \quad \text{Eq. (8)}$$

La incertidumbre asociada a los cambios de volumen debido a variaciones de la temperatura fue calculado a través del coeficiente de expansión del n-hexano, asumiendo una distribución rectangular para un intervalo de temperatura de 20 ± 5 °C. La tolerancia del material volumétrico empleado, concretamente una jeringa de 1000 µL con una división mínima de 10 µL, se calculó asumiendo una distribución triangular. La incertidumbre de la repetibilidad, debida a las variaciones del volumen tomado al llenar la jeringa hasta un nivel determinado, ha sido calculada como la desviación estándar de las 8 pesadas repetidas de una jeringa, llenas hasta la marca de 1 mL, con n-hexano. Los resultados obtenidos están recogidos en la Tabla XXIV.

Tabla XXIV: Cálculo de la incertidumbre asociada al volumen final de muestra.

Rango Hidrocarburos	Volumen (mL)	Δ T (°C)	C _{EXP} x 10 ⁻³ (°C ⁻¹)	División (mL)	s x 10 ⁻⁴ (g)	masa (g)	u _R (Vol) x 10 ⁻³
Alifáticos							
>C ₁₀ – C ₁₂	1	5	1,35	0,01	2,26	0,658	5,65
>C ₁₂ – C ₁₆	1	5	1,35	0,01	2,26	0,658	5,65
>C ₁₆ – C ₂₁	1	5	1,35	0,01	2,26	0,658	5,65
>C ₂₁ – C ₃₅	1	5	1,35	0,01	2,26	0,658	5,65
>C ₃₅	1	5	1,35	0,01	2,26	0,658	5,65
Aromáticos							
>EC ₁₀ – EC ₁₂	1	5	1,35	0,01	2,26	0,658	5,65
>EC ₁₂ – EC ₁₆	1	5	1,35	0,01	2,26	0,658	5,65
>EC ₁₆ – EC ₂₁	1	5	1,35	0,01	2,26	0,658	5,65
>EC ₂₁ – EC ₃₅	1	5	1,35	0,01	2,26	0,658	5,65
>EC ₃₅	1	5	1,35	0,01	2,26	0,658	5,65
TPH	1	5	1,35	0,01	2,26	0,658	5,65

3.2.1.3. Incertidumbre asociada al cálculo de los factores de calibración.

Se han analizado por triplicado seis disoluciones de hidrocarburos a una concentración individual que oscilaba entre 10 y 400 µg mL⁻¹ para los hidrocarburos alifáticos y entre 1 y 100 µg mL⁻¹ para los hidrocarburos aromáticos. Las concentraciones de cada rango han quedado reflejadas en las Tablas XI y XIII de este informe. La Eq. (9) permite calcular el factor de calibración de cada rango de hidrocarburos.

$$FC = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \left(\frac{Area_{Rango}}{Conc_{Inyectada}} \right) \tag{Eq. (9)}$$

De este modo, la incertidumbre asociada al cálculo de los factores de calibración es una combinación de dos fuentes de incertidumbre: la contribución del área del pico cromatográfico y la concentración de las disoluciones de calibrado. (Eq. (10)).

$$u_R(FC) = \sqrt{\left(\frac{u(Area_{pat})}{Area_{pat}} \right)^2 + \left(\frac{u(C_{Dis})}{C_{Dis}} \right)^2} \tag{Eq. (10)}$$

3.2.1.3.1. Incertidumbre del área cromatográfica de las disoluciones de calibrado.

La incertidumbre de las áreas obtenidas al medir las disoluciones de calibrado presenta dos contribuciones principales: la incertidumbre asociada al área mínima que el sistema de tratamiento de datos puede analizar, que se calculó asumiendo una distribución triangular, y la incertidumbre debida a la repetibilidad de la medida, que se evaluó como la desviación estándar de una disolución de hidrocarburos (20 µg mL⁻¹) inyectada seis veces

consecutivas. Por lo tanto, la Eq. (11) recoge la expresión matemática para calcular la incertidumbre asociada a la medida del área de las disoluciones de calibrado.

$$u_R(Area_{pat}) = \frac{u(Area_{pat})}{Area_{pat}} = \sqrt{\left(\frac{resolución/\sqrt{3}}{Area}\right)^2 + \left(\frac{s}{Area}\right)^2} \quad \text{Eq. (11)}$$

Los resultados obtenidos están resumidos en la Tabla XXV. Como puede verse, la contribución más importante se debe a la repetibilidad de la medida. Hay que destacar que para el caso de los rangos de hidrocarburos aromáticos esta contribución es dos veces mayor que para los rangos de hidrocarburos alifáticos.

Tabla XXV: Incertidumbre asociada al área medida en las disoluciones de calibrado.

Rango Hidrocarburos	$u_R(Area) \times 10^{-10}$	$Area_{pat} \times 10^6 (pA s)$	$s (n=8) \times 10^6 (pA s)$	$u_R(Area_{pat}) \times 10^{-2}$
Alifáticos				
>C ₁₀ – C ₁₂	129	45	0,5	1,250
>C ₁₂ – C ₁₆	35,0	165	2,2	1,354
>C ₁₆ – C ₂₁	55,5	104	0,9	0,826
>C ₂₁ – C ₃₅	17,8	324	4,3	1,340
>C ₃₅	221	26	0,7	2,616
Aromáticos				
>EC ₁₀ – EC ₁₂	349	16	0,4	2,540
>EC ₁₂ – EC ₁₆	93,0	62	2,7	4,428
>EC ₁₆ – EC ₂₁	103	56	2,4	4,279
>EC ₂₁ – EC ₃₅	197	29	1,3	4,455
>EC ₃₅	210	27	0,8	2,803
TPH	6,75	855	15	1,773

3.2.1.3.2. Incertidumbre asociada a la preparación de las disoluciones de calibrado.

Para calcular los factores de calibración correspondientes a cada rango de hidrocarburos fue necesario preparar por dilución de un patrón analítico, seis disoluciones a diferente concentración por triplicado (Ver Tablas I y II). La concentración de cada disolución de calibrado se calcula de acuerdo a la Eq. (12):

$$C_{Dis} = C_{Pat} \times \frac{V_o}{V_F} \quad \text{Eq. (12)}$$

Donde C_{Dis} es la concentración de la disolución de calibrado, C_{Pat} es la concentración del patrón analítico de partida, V_o es el volumen de patrón analítico y V_F es el volumen final de la disolución de calibrado (Ver Tablas I y II). Por consiguiente la incertidumbre asociada a la concentración de las disoluciones de calibrado tiene tres contribuciones, de acuerdo a la Eq.(13):

$$u_R(C_{Dis}) = \left(\frac{u(C_{Dis})}{C_{Dis}} \right) = \sqrt{\left(\frac{u(C_{Pat})}{C_{Pat}} \right)^2 + \left(\frac{u(V_o)}{V_o} \right)^2 + \left(\frac{u(V_F)}{V_F} \right)^2} \quad \text{Eq. (13)}$$

Para calcular la incertidumbre de los patrones analíticos empleados (ver punto 2.1.3. de este informe) se ha empleado la pureza suministrada por el fabricante. Se ha asumido una distribución triangular de la diferencia entre la concentración real y la concentración estimada. Los resultados están resumidos en la Tabla XXVI.

Tabla XXVI: Incertidumbre asociada a la concentración de los patrones analíticos.

Rango Hidrocarburos	Conc. Teórica (µg mL ⁻¹)	Conc. Real (µg mL ⁻¹)	Diferencia (µg mL ⁻¹)	u(C _{Pat}) (µg mL ⁻¹)	u _R (C _{Pat})
Alifáticos					
>C ₁₀ – C ₁₂	1000	994,8	5,2	3,002	3,018 x 10 ⁻⁰³
>C ₁₂ – C ₁₆	2000	1982,4	17,6	10,161	5,126 x 10 ⁻⁰³
>C ₁₆ – C ₂₁	3500	3487,4	12,6	7,275	2,086 x 10 ⁻⁰³
>C ₂₁ – C ₃₅	7000	6979,5	20,5	11,836	1,696 x 10 ⁻⁰³
>C ₃₅	2500	2493,7	6,3	3,637	1,459 x 10 ⁻⁰³
Aromáticos					
>EC ₁₀ – EC ₁₂	100	99,8	0,2	0,115	1,157 x 10 ⁻⁰³
>EC ₁₂ – EC ₁₆	200	197,5	2,5	1,443	7,308 x 10 ⁻⁰³
>EC ₁₆ – EC ₂₁	500	496,5	3,5	2,021	4,070 x 10 ⁻⁰³
>EC ₂₁ – EC ₃₅	500	495	5	2,887	5,832 x 10 ⁻⁰³
>EC ₃₅	300	297,5	2,5	1,443	4,852 x 10 ⁻⁰³
TPH	16000	15937,8	62,2	35,911	2,253 x 10 ⁻⁰³

De acuerdo a la Eq. (8) de este informe, para calcular la incertidumbre asociada al volumen se deben considerar tres fuentes de incertidumbre. Por otro lado, el material volumétrico necesario para preparar las disoluciones de calibrado son las jeringas de 50 y 100 µL (Ver Tablas I y II). La incertidumbre relativa asociada al empleo de estas dos jeringas, calculada de acuerdo a la ecuación 9, ha sido de 5,525 x 10⁻³ para la jeringa de 50 µL y de 6,071 x 10⁻³ para la jeringa de 100 µL.

Una vez evaluadas las incertidumbres del patrón analítico y del material volumétrico, la Tabla XXVII recoge la incertidumbre asociada a la preparación de las seis disoluciones de calibrado. De todos modos, la incertidumbre de la preparación de las seis disoluciones de calibrado es la suma de las incertidumbres asociadas a cada disolución de calibrado, de acuerdo la Eq. (14):

$$\left(\frac{u(C_{Dis})}{C_{Dis}} \right)_{Total} = \sum_{i=1}^{n=6} \left(\frac{u(C_{Dis(i)})}{C_{Dis(i)}} \right) \quad \text{Eq. (14)}$$

Tabla XXVII: Incertidumbre asociada a la preparación de las seis disoluciones de calibrado.

Rango Hidrocarburos	$u_R(C_1)$ $\times 10^{-3}$	$u_R(C_2)$ $\times 10^{-3}$	$u_R(C_3)$ $\times 10^{-3}$	$u_R(C_4)$ $\times 10^{-3}$	$u_R(C_5)$ $\times 10^{-3}$	$u_R(C_6)$ $\times 10^{-3}$	$u_R(C_{Tot})$ $\times 10^{-2}$
Alifáticos							
>C ₁₀ – C ₁₂	6,78	9,10	9,10	8,75	8,75	8,75	2,10
>C ₁₂ – C ₁₆	7,95	1,00	10,0	9,68	9,68	9,68	2,33
>C ₁₆ – C ₂₁	6,42	8,84	8,84	8,47	8,47	8,47	2,03
>C ₂₁ – C ₃₅	6,30	8,75	8,75	8,38	8,38	8,38	2,01
>C ₃₅	6,24	8,71	8,71	8,34	8,34	8,34	1,20
Aromáticos							
>EC ₁₀ – EC ₁₂	6,18	8,67	8,66	8,29	8,29	8,29	1,99
>EC ₁₂ – EC ₁₆	9,50	1,13	11,3	11,0	11,0	11,0	2,66
>EC ₁₆ – EC ₂₁	7,31	9,50	9,50	9,16	9,16	9,16	2,20
>EC ₂₁ – EC ₃₅	8,42	10,4	10,4	10,1	10,1	10,1	2,43
>EC ₃₅	7,77	9,86	9,86	9,53	9,53	9,53	2,30
TPH	6,48	8,88	8,88	8,51	8,51	8,51	2,04

Evaluadas las dos contribuciones que afectan a la incertidumbre del cálculo de los factores de calibración, la Tabla XXVIII recoge la incertidumbre correspondiente a cada rango de hidrocarburos, calculada de acuerdo a la ecuación 11.

Tabla XXVIII: Incertidumbre asociada al cálculo de los factores de calibración.

Hidrocarburos alifáticos	$u_R(FC)$ $\times 10^{-2}$	Hidrocarburos aromáticos	$u_R(FC)$ $\times 10^{-2}$
>C ₁₀ – C ₁₂	2,444	>EC ₁₀ – EC ₁₂	3,227
>C ₁₂ – C ₁₆	2,695	>EC ₁₂ – EC ₁₆	5,166
>C ₁₆ – C ₂₁	2,191	>EC ₁₆ – EC ₂₁	4,811
>C ₂₁ – C ₃₅	2,416	>EC ₂₁ – EC ₃₅	5,074
>C ₃₅	2,878	>EC ₃₅	3,626
TPH	2,705	-	-

3.2.1.4. Incertidumbre asociada a la masa de muestra analizada.

La muestra de suelo debe ser pesada en una balanza analítica, siendo las principales fuentes de incertidumbre para esta medida la calibración de la balanza y la repetibilidad de la pesada. La incertidumbre asociada a la calibración de la balanza se obtiene del certificado del fabricante (para pesadas inferiores a 10 gramos, la incertidumbre es $3,1 \times 10^{-5}$ gramos). La incertidumbre asociada a la repetibilidad se calcula como la desviación estándar de la pesada (n=8) de una alícuota cada 5 minutos y asumiendo una distribución rectangular. Esta incertidumbre es igual para todos los rangos de hidrocarburos estudiados, y la expresión para calcularla está recogida en la Eq. (15):

$$u_R(m) = \frac{u(m)}{m} = \sqrt{\left(\frac{u(\text{calibración})}{m}\right)^2 + \left(\frac{s/\sqrt{3}}{m}\right)^2}$$

$$= \sqrt{\left(\frac{3.1 \times 10^{-5}}{1.01}\right)^2 + \left(\frac{6.96 \times 10^{-4}/\sqrt{3}}{1.01}\right)^2} = 3.990 \times 10^{-4}$$

Eq. (15)

3.2.1.5. Incertidumbre asociada a la recuperación.

Para calcular la recuperación de cada rango de hidrocarburos, y por consiguiente establecer la incertidumbre asociada, se ha llevado a cabo un estudio de recuperación. Éste consistió en analizar ocho alícuotas del material de referencia certificado CRM-372. La recuperación obtenida para cada rango de hidrocarburos se calcula de acuerdo a la Eq. (16):

$$\text{Recuperación}(\%) = \frac{\text{Conc}(\text{medida})}{\text{Conc}(\text{certificada})}$$

Eq. (16)

La incertidumbre asociada a la recuperación implica, entre otras fuentes de incertidumbre, la incompleta extracción de los hidrocarburos mediante la radiación de microondas, las pérdidas a lo largo de la SPE, pérdidas en las etapas de concentración y también la robustez de la instrumentación empleada. La incertidumbre asociada a la recuperación se calcula de acuerdo a la Eq. (17):

$$u_R(\text{Rec}) = \frac{u(\text{Rec})}{\text{Rec}} = \left(\frac{s/\sqrt{n}}{\text{Rec}}\right)$$

Eq. (17)

Los resultados obtenidos para todos los rangos de hidrocarburos están resumidos en la Tabla XXIX.

Tabla XXIX: Cálculo de la incertidumbre asociada a la recuperación de la metodología para analizar hidrocarburos en muestras sólidas.

Rango Hidrocarburos	Recuperación (%)								u _R (R) x 10 ⁻²		
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	(H)	Tot	s	
Alifáticos											
>C ₁₀ - C ₁₂	121	151	106	97	109	105	115	106	114	17	5,14
>C ₁₂ - C ₁₆	107	95	87	77	89	88	95	102	92	9	3,55
>C ₁₆ - C ₂₁	104	93	94	87	90	88	94	93	93	5	1,96
>C ₂₁ - C ₃₅	130	120	127	125	120	119	127	124	124	4	1,13
Aromáticos											
>EC ₁₀ - EC ₁₂	175	179	138	207	212	422	183	264	222	88	14,1
>EC ₁₂ - EC ₁₆	134	119	191	85	121	128	107	111	125	31	8,72
>EC ₁₆ - EC ₂₁	132	123	149	98	120	127	113	118	122	15	4,31
>EC ₂₁ - EC ₃₅	230	148	190	141	149	180	145	151	167	31	6,60
TPH	120	-	91	91	87	138	103	78	101	21	7,38

3.2.1.6. Estimación de la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida.

El último paso para determinar la incertidumbre del análisis de los rangos de hidrocarburos consiste en combinar todas las fuentes de incertidumbre y calcular la incertidumbre combinada. Se han identificado y evaluado un total de cinco fuentes de incertidumbre. En la Figura VII se presentan, para todos los rangos de hidrocarburos, las incertidumbres estándar de las cinco contribuciones.

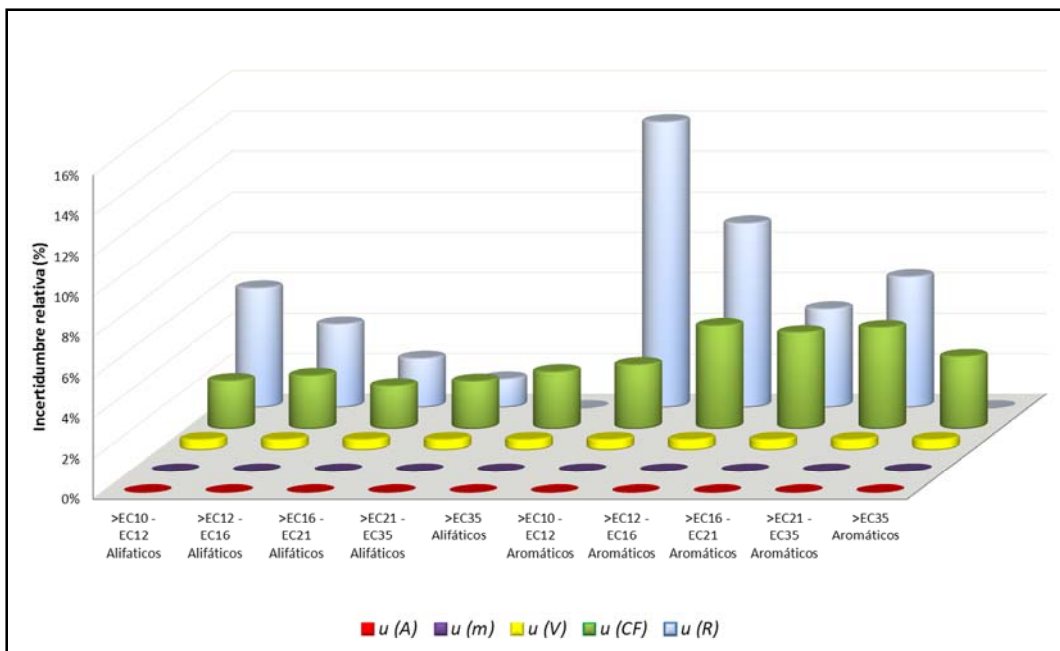


Figura VII: Incertidumbres estándar de las cinco fuentes de incertidumbres identificadas para el análisis de rangos de hidrocarburos en muestras de suelo.

Asumiendo que las cinco fuentes de incertidumbre son independientes, la expresión matemática para calcular la incertidumbre combinada está dada por la Eq. (18):

$$u_c(\text{Hidrocarburo}) = \sqrt{\left(\frac{u(\text{Área})}{\text{Área}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Volume})}{\text{Volume}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{FC})}{\text{FC}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Masa})}{\text{Masa}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Recuperación})}{\text{Recuperación}}\right)^2} \quad \text{Eq. (18)}$$

La incertidumbre combinada define un intervalo en torno al valor medido en el cual se debe encontrarse el valor verdadero con un cierto nivel de confianza. Esta incertidumbre se calcula multiplicado la incertidumbre combinada por un factor de cobertura. Debido a que el número de réplicas usadas para calcular las variaciones aleatorias ha sido superior a seis, es posible usar como factor de cobertura $k=2$, para un nivel de confianza del 95 %. La Tabla XXX recoge los valores de la incertidumbre estándar y combinada asociada al análisis de los rangos de hidrocarburos en muestras sólidas.

Tabla XXX: Incertidumbre combinada y expandida asociada al análisis de los rangos de hidrocarburos en muestras de suelo.

Hidrocarburos alifáticos	U_c (%)	U_E (%)	Hidrocarburos aromáticos	U_c (%)	U_E (%)
>C ₁₀ – C ₁₂	9	17	>EC ₁₀ – EC ₁₂	15	30
>C ₁₂ – C ₁₆	6	13	>EC ₁₂ – EC ₁₆	11	22
>C ₁₆ – C ₂₁	5	9	>EC ₁₆ – EC ₂₁	9	19
>C ₂₁ – C ₃₅	3	6	>EC ₂₁ – EC ₃₅	10	20
>C ₃₅	4	8	>EC ₃₅	10	21
TPH	9	19	-	-	-

3.2.2. Incertidumbre en las muestras de agua subterráneas.

La concentración de los rangos de hidrocarburos en las muestras acuosas, expresada como mg L^{-1} , se obtiene a partir de la Eq. (19).

$$\text{Concentración rango}_{(\text{mg L}^{-1})} = \frac{A \times V_F}{CF \times V_M \times 1000} \times \frac{1}{R} \quad \text{Eq. (19)}$$

Dónde A se corresponde al área total del rango medido; V_F es el volumen de hexano en el que se diluye la muestra antes de ser inyectada (1 mL); CF es el factor de calibración del rango; V_M es el volumen de la muestra analizada (0,1 Litro); R es la recuperación de cada rango.

Del mismo modo que ocurría con el método de análisis para muestras sólidas, todas las variables de la ecuación 20 son potenciales fuentes de incertidumbre. El diagrama de causa y efecto, presentado en la Figura VIII, facilita la identificación y cuantificación de cada fuente, impidiendo la estimación de una fuente por duplicado.

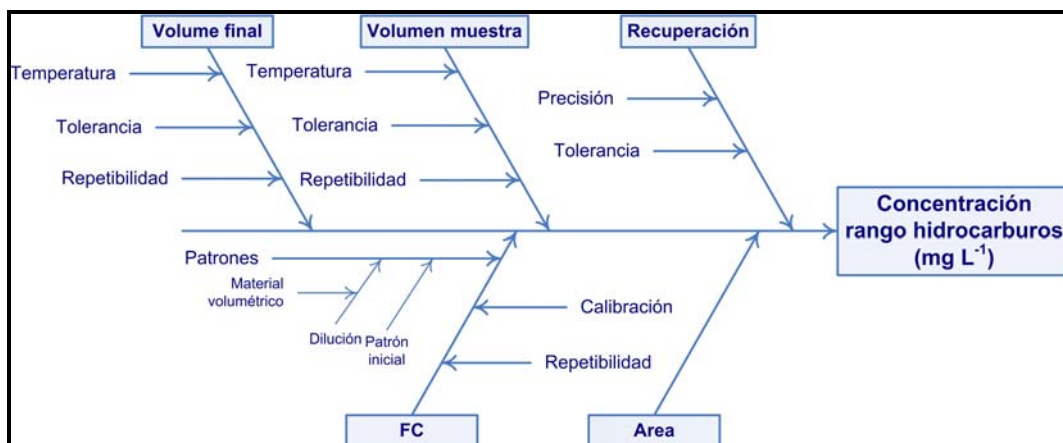


Figura VIII: Diagrama de causa y efecto para evaluar la incertidumbre asociada a la determinación de hidrocarburos en muestras de suelo.

La incertidumbre asociada a la medida del área cromatográfica, al cálculo de los factores de calibración y al volumen final de hexano en el que es diluida la muestra es igual a la incertidumbre calculada para el método de análisis de muestras sólidas. Sin embargo, la incertidumbre asociada al volumen inicial de la muestra y la incertidumbre asociada a la recuperación son diferentes y deben ser evaluadas.

3.2.2.1. Incertidumbre asociada al volumen inicial de muestra.

Las muestras de agua deben ser medidas para determinar el volumen de muestra que va a ser analizado. Para realizar esta medida se emplean probetas de diferente volumen, las más empleadas son las de 100 y 250 mL, con el fin de medir con precisión el volumen de muestra. La incertidumbre asociada a la medida del volumen tiene tres contribuciones principales: efecto de la temperatura, la tolerancia del material volumétrico y la repetibilidad de la medida. Siguiendo el procedimiento descrito en el punto 3.2.1.2. de este informe, se calculará incertidumbre del volumen de agua medido por una probeta de 100 mL y otra de 250 mL, siguiendo la ecuación 9. Los resultados obtenidos están recogidos en la Tabla XXXI.

Tabla XXXI: Cálculo de la incertidumbre asociada al volumen inicial de muestra acuosa.

Probeta (mL)	ΔT (°C)	C_{EXP} ($\times 10^{-4}$ °C ⁻¹)	División (mL)	s (g)	masa (g)	$u_R(Vol)$ ($\times 10^{-3}$)
100	5	2,1	1	0,319	99,975	5,220
250	5	2,1	2	0,373	249,025	3,644

3.2.2.2. Incertidumbre asociada a la recuperación.

Del mismo modo que para el método para analizar hidrocarburos en suelos, para calcular la recuperación de cada rango de hidrocarburos se ha llevado a cabo un estudio de

recuperación. Éste consistió en analizar ocho alícuotas del material de referencia certificado PE-1799. La recuperación obtenida para cada rango de hidrocarburos se calcula de acuerdo a la ecuación 17, mientras que la incertidumbre asociada a la recuperación se calcula de acuerdo a la ecuación 18. Los resultados obtenidos para todos los rangos de hidrocarburos están recogidos en la Tabla XXXII.

Tabla XXXII: Cálculo de la incertidumbre asociada a la recuperación de la metodología para analizar hidrocarburos en muestras líquidas.

Rango Hidrocarburos	Recuperación (%)								u _R (R) x 10 ⁻²		
	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	(H)	Tot.	s	
Alifáticos											
>C ₁₀ – C ₁₂	48	60	32	39	58	73	53	48	51	13	9,01
>C ₁₂ – C ₁₆	62	77	45	50	68	77	69	62	64	12	6,63
>C ₁₆ – C ₂₁	70	90	46	58	75	85	82	71	72	15	7,36
>C ₂₁ – C ₃₅	110	121	102	104	111	112	117	84	108	11	3,60
Aromáticos											
>EC ₁₀ – EC ₁₂	29	40	24	30	45	45	40	41	37	8	7,64
>EC ₁₂ – EC ₁₆	46	58	38	46	62	62	59	62	54	9	5,89
>EC ₁₆ – EC ₂₁	71	84	46	65	84	83	84	89	76	14	6,51
>EC ₂₁ – EC ₃₅	40	40	32	34	37	37	38	41	37	3	2,86

3.2.2.3. Cálculo de la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida.

Al igual que para el método de análisis en muestras de suelo, se han identificado y evaluado un total de cinco fuentes de incertidumbre. En la Figura IX se presentan las incertidumbres estándar de las cinco contribuciones de la determinación de los rangos de hidrocarburos en muestras de agua.

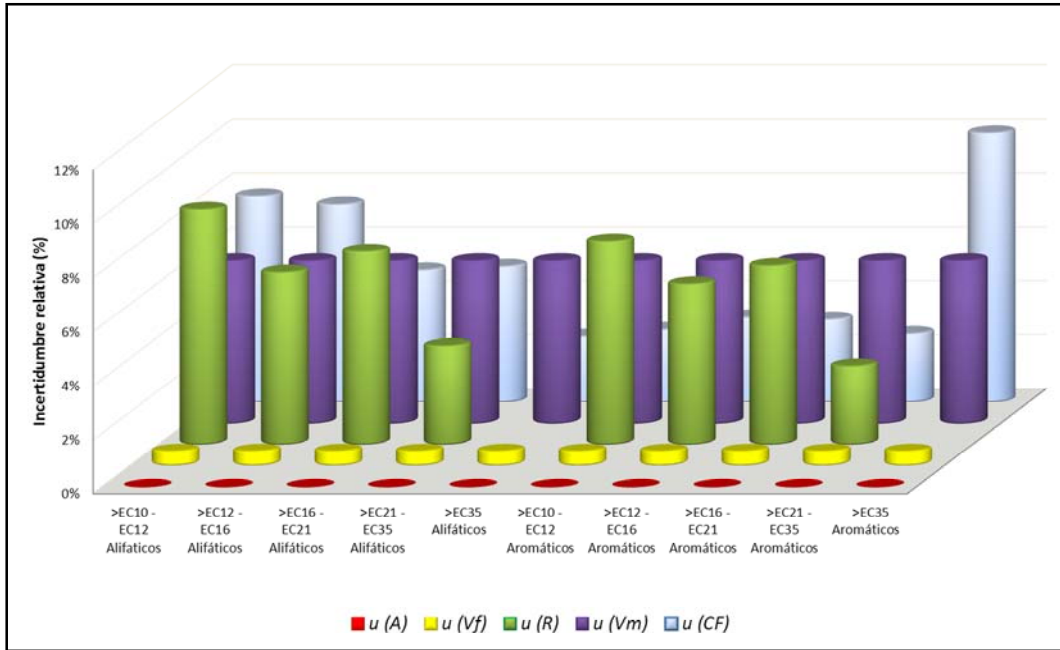


Figura IX: Incertidumbres estándar de las cinco fuentes de incertidumbres identificadas para el análisis de rangos de hidrocarburos en muestras de agua.

Se han considerado las cinco fuentes de incertidumbre independientes, por lo que la expresión matemática para calcular la incertidumbre combinada está dada por la Eq. (20), mientras que para calcular la incertidumbre expandida se multiplica la incertidumbre combinada por el factor de cobertura k=2.

$$u_c(HC) = \sqrt{\left(\frac{u(\text{Área})}{\text{Area}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Vol}_F)}{\text{Vol}_F}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{FC})}{\text{FC}}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Vol}_M)}{\text{Vol}_M}\right)^2 + \left(\frac{u(\text{Recuperación})}{\text{Recuperación}}\right)^2} \tag{Eq. (20)}$$

La Tabla XXXIII recoge los valores de la incertidumbre estándar y combinada asociada al análisis de los rangos de hidrocarburos en muestras de agua.

Tabla XXXIII: Incertidumbre combinada y expandida asociada al análisis de los rangos de hidrocarburos en muestras de agua.

Hidrocarburos alifáticos	U _c (%)	U _E (%)	Hidrocarburos aromáticos	U _c (%)	U _E (%)
>C ₁₀ – C ₁₂	13	26	>EC ₁₀ – EC ₁₂	10	20
>C ₁₂ – C ₁₆	12	23	>EC ₁₂ – EC ₁₆	9	18
>C ₁₆ – C ₂₁	11	21	>EC ₁₆ – EC ₂₁	10	19
>C ₂₁ – C ₃₅	9	18	>EC ₂₁ – EC ₃₅	7	14
>C ₃₅	7	13	>EC ₃₅	12	23
TPH	18	35	-	-	-

4. CONCLUSIONES.

Se han desarrollado dos procedimientos analíticos para determinar el contenido del TPH y varios rangos de hidrocarburos en muestras de suelo y aguas subterráneas.

El método de análisis de hidrocarburos en muestras sólidas se basa en una extracción mediante radiación por microondas, seguida de una etapa de extracción en fase sólida y una última etapa de análisis mediante GC-FID.

El método de análisis de los hidrocarburos en muestras líquidas se basa en una extracción en fase sólida empleando adsorbentes de fase inversa, un fraccionamiento con adsorbentes de fase normal y una última etapa de análisis mediante GC-FID.

La viabilidad de ambos procedimientos ha sido demostrada mediante un estudio de validación. Se han establecido varios parámetros analíticos como la linealidad, sesgo, exactitud, trazabilidad, precisión y límites de detección.

Se ha procedido a realizar el cálculo de la incertidumbre asociada a la determinación de hidrocarburos en muestras de suelo y aguas subterráneas.

Estos procedimientos analíticos son parte esencial del proyecto BIOXISOIL, al ser responsables de la caracterización inicial del área contaminada y de monitorizar el grado de descontaminación conseguido al aplicar las diferentes tecnologías de descontaminación.

Validación de la metodología para el análisis de muestras de suelo.

Las recuperaciones obtenidas al aplicar el procedimiento de análisis de los hidrocarburos presentes en muestras de suelo han sido superiores al 90 % para todos los rangos.

El estudio de los blancos para las muestras de suelo ha demostrado la necesidad de limpiar perfectamente el sistema de extracción por microondas, ya que se ha comprobado que varias vasijas son las responsables de generar blancos más elevados, pudiendo afectar a la posterior determinación de los rangos de hidrocarburos.

La precisión y la exactitud del análisis de los rangos de hidrocarburos aromáticos en muestras de suelo son menores que para los rangos de hidrocarburos alifáticos.

El factor de calibración de los dos rangos de hidrocarburos alifáticos más pesados, $>C_{21}-C_{35}$ y $>C_{35}$, no es constante y varía ligeramente con el número de inyecciones. Este

factor debe ser recalculado periódicamente para evitar errores en la cuantificación de estos rangos de hidrocarburos.

La trazabilidad del método de análisis para determinar los rangos de hidrocarburos contenidos en muestras de suelo ha quedado demostrada mediante el análisis de tres materiales de referencia certificada.

No se ha observado efecto matriz para el análisis de hidrocarburos en muestras de suelo.

Validación de la metodología para el análisis de muestras de agua.

Las recuperaciones obtenidas para el análisis de los rangos de hidrocarburos alifáticos han sido superiores al 70 %, mientras que para los rangos de hidrocarburos aromáticos han sido ligeramente inferiores, con valores próximos al 50 %. Estas recuperaciones son bajas, pero están dentro de los límites aceptados por los materiales de referencia empleados.

La trazabilidad del procedimiento ha sido demostrada mediante el análisis de tres materiales de referencia certificada. Para determinar el contenido de TPH en agua el error relativo ha sido del 2 %. Los valores para los rangos de hidrocarburos alifáticos y aromáticos a elevada y baja concentración están dentro de los límites aceptados por los materiales de referencia.

La repetibilidad y la precisión intermedia para el análisis de los rangos de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en agua son similares, con valores de RDS inferiores al 7 %.

El análisis de blancos no ha presentado valores significativos de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, debido a la baja solubilidad de éstos en agua.

Cálculo de la incertidumbre asociada al análisis de muestras de suelo.

Se han identificado y cuantificado 5 fuentes de incertidumbre para el análisis de los rangos de hidrocarburos en muestras de suelo: factor de calibración, recuperación, volumen final, masa de suelo y área cromatográfica.

Las dos contribuciones más importantes son debidas al cálculo del factor de calibración y a la recuperación de la metodología. Las otras tres contribuciones podrían ser desestimadas.

La incertidumbre asociada al cálculo de los factores de calibración para los rangos de hidrocarburos aromáticos es mayor que para los hidrocarburos alifáticos. Esta afirmación está en concordancia con el hecho de que la determinación de los rangos de hidrocarburos aromáticos sea menos precisa y exacta que para los hidrocarburos alifáticos.

La incertidumbre asociada a la recuperación es la contribución más importante, siendo mayor para los rangos de hidrocarburos más ligeros, debido a que estos se encuentran localizados en la zona del cromatograma que presentaba blancos más elevados.

La incertidumbre expandida oscila entre el 9 % – 17 % para los rangos de hidrocarburos alifáticos y entre 19 % – 30 % para los rangos de hidrocarburos aromáticos.

Cálculo de la incertidumbre asociada al análisis de muestras de agua.

Similarmente al análisis de muestras sólidas, se han identificado y cuantificado 5 fuentes de incertidumbre para el análisis de los rangos de hidrocarburos en muestras de agua subterránea: factor de calibración, recuperación, volumen final, volumen de muestra y área cromatográfica.

Únicamente las contribuciones asociadas al área cromatográfica y al volumen final pueden ser omitidas.

Las contribuciones de la recuperación y del factor de calibración tienen valores similares a las obtenidas en el procedimiento de análisis de suelos. Sin embargo la incertidumbre asociada al volumen de muestra analizada, está en torno al 5 %. Esta contribución es mucho mayor que la contribución del peso de sedimento analizado, por lo que se puede concluir que el análisis de los TPH en nuestro de aguas tiene una mayor incertidumbre que el análisis en muestras de suelo.

La incertidumbre expandida oscila entre el 13 % – 26 % para los rangos de hidrocarburos alifáticos y entre 14 % – 23 % para los rangos de hidrocarburos aromáticos.

5. AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo ha sido desarrollado dentro del ámbito del proyecto europeo BIOXISOIL: Nueva aproximación a la regeneración de terrenos combinando procesos de oxidación biológicos y químicos (Life 11 ENV/ES/505). Los autores quieren agradecer la financiación recibida por parte del programa Life+2011.

6. REFERENCIAS.

- [1] F. Coulon, M.J. Whelan, G.I. Paton, K.T. Semple, R. Villa, S.J.T. Pollard, *Chemosphere*, 81 (2010) 1454-1462.
- [2] E. Saari, P. Peramaki, J. Jalonen, *Microchem J.*, 87 (2007) 113-118.
- [3] M. Voyevoda, W. Geyer, S. Mothes, *Clean-Soil Air Water*, 36 (2008) 164-170.
- [4] J. Li, J. Zhang, Y. Lu, Y. Chen, S. Dong, H. Shim, *Environmental Monitoring and Assessment*, 184 (2012) 281-287.
- [5] C. Dumitran, O. Ion, D. Florinel, *Rev. Chim.*, 60 (2009) 1335-1337.
- [6] E. Saari, P. Peramaki, J. Jalonen, *Chemometrics Intell. Lab. Syst.*, 92 (2008) 3-12.
- [7] R. Iturbe, C. Flores, R.M. Flores, L.G. Torres, *Chemosphere*, 61 (2005) 1618-1631.
- [8] G. Moussavi, A. Bagheri, *Environmental Technology*, 33 (2012) 1905-1912.
- [9] J.M.E. Ahad, L. Burns, S. Mancini, G.F. Slater, *Environmental Science & Technology*, 44 (2010) 5092-5097.
- [10] I. Zrafi-Nouira, Z. Khedir-Ghenim, R. Bahri, I. Cheraeif, M. Rouabhia, D. Saidane-Mosbahi, *Water Air and Soil Pollution*, 202 (2009) 19-31.
- [11] H. Shim, W. Ma, A. Lin, K. Chan, *Journal of Environmental Sciences-China*, 21 (2009) 758-763.
- [12] I.A. Ololade, L. Lajide, I.A. Amoo, *Central European Journal of Chemistry*, 7 (2009) 83-89.
- [13] B.-M. Yang, C.-M. Kao, C.-W. Chen, W.-P. Sung, R.Y. Surampalli, *Frontiers of Manufacturing and Design Science II*, Pts 1-6, 121-126 (2011) 196-200.
- [14] C. Wan, M. Du, D.-J. Lee, X. Yang, W. Ma, L. Zheng, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42 (2011) 972-975.
- [15] R. Thangarajan, E.M. Adetutu, R.B. Moore, S.T. Ogunbanwo, A.S. Ball, *African Journal of Biotechnology*, 10 (2011) 15151-15162.
- [16] J. Machackova, Z. Wittlingerova, K. Vlk, J. Zima, A. Linka, *Water Air and Soil Pollution*, 187 (2008) 181-194.
- [17] W. Weisman, *Petroleum Hydrocarbon analysis of Soil and Water in the Environment*, Amherst Scientific Publishers, Amherst, MA, 1997.
- [18] J.B. Gustafson, J.G. Tell, D. Orem, *Selection of representative TPH fractions based on fate and transport considerations*, Vol. 3. ed., Amherst Scientific Publishing, Amherst, MA, 1997.

- [19] ISO 16703. Soil quality- determination of content of hydrocarbons in the range C10 to C40 by gas chromatography, 2004.
- [20] P. Sainio, I. Mäkinen, J.-W. Hutter, T. den Ouden, M. Krysell, Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement, 11 (2006) 116-121.
- [21] M. Koch, A. Liebich, T. Win, I. Nehls, A. Kvernheim, O. Ringstad, F. Oreld, Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement, 11 (2006) 122-129.
- [22] Characterization of waste - determination of hydrocarbon content in the range of C10 to C40 by gas chromatography. , Brussels, 2004.
- [23] Directive 2006/11/EC . Protection of groundwater against pollution and deterioration, 2006.
- [24] D. Mao, R. Lookman, H. Van de Weghe, R. Weltens, G. Vanermen, N. De Brucker, L. Diels, Environmental Science & Technology, 43 (2009) 7651-7657.
- [25] E. Rozet, R.D. Marini, E. Ziemons, B. Boulanger, P. Hubert, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 55 (2011) 848-858.
- [26] International Vocabulary of Basis and General Terms in Metrology, ISO Geneve, 1993.
- [27] International Vocabulary of Metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM), Joint Committee for guides in Metrology, 2008.
- [28] Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement, Joint Committe for Guides in Metrology, 2008.
- [29] EURACHEM, CITAC Guide CG 4. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, 2nd Edition, 2000.
- [30] Ó. Pindado Jiménez, R.M. Pérez Pastor, Analytica Chimica Acta, 724 (2012) 20-29.
- [31] O. Pindado Jiménez, R.M. Pérez Pastor, S. García Alonso, Talanta, 80 (2010) 1121-1128.
- [32] P. Fisicaro, A. Adriaens, E. Ferrara, E. Prenesti, Analytica Chimica Acta, 597 (2007) 75-81.
- [33] S. Yenisoy-Karakas, Analytica Chimica Acta, 571 (2006) 298-307.
- [34] N. Ratola, L. Santos, P. Herbert, A. Alves, Analytica Chimica Acta, 573-574 (2006) 202-208.
- [35] S. de Melo Abreu, P. Caboni, P. Cabras, V. Luigi Garau, A. Alves, Analytica Chimica Acta, 573-574 (2006) 291-297.
- [36] L. Cuadros-Rodríguez, M.E. Hernández Torres, E. Almansa López, F.J. Egea González, F.J. Arrebola Liébanas, J.L. Martínez Vidal, Analytica Chimica Acta, 454 (2002) 297-314.

