

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0

INDICE

- 1.- OBJETO
- 2.- CAMPO DE APLICACIÓN
- 3.- DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA
- 4.- DEFINICIONES
 - 4.1. Siglas y acrónimos.
- 5.- DESCRIPCIÓN
 - 5.1. Principio del método.
 - 5.2. Instrumentación, materiales y reactivos.
 - 5.2.1. Instrumentación.
 - 5.2.2. Materiales.
 - 5.2.3. Patrones, disolventes y gases.
 - 5.3. Preparación de patrones y reactivos.
 - 5.4. Conservación y mantenimiento de las muestras.
 - 5.5. Procedimiento de limpieza.
 - 5.6. Tratamiento de la muestra.
 - 5.6.1. Centrifugación.
 - 5.6.2. Extracción en fase sólida.
 - 5.6.3. Etapa de lavado.
 - 5.6.4. Fraccionamiento mediante cartuchos de fase normal.
 - 5.7. Análisis cromatográfico.
 - 5.7.1. Condiciones de operación.
 - 5.7.2. Definición del rango de hidrocarburos
 - 5.7.3. Cuantificación de los rangos de hidrocarburos.
 - 5.8. Cálculo de resultados.
 - 5.9. Control de calidad.
 - 5.9.1. Intervalo dinámico lineal.
 - 5.9.2. Recuperación.
 - 5.9.3. Precisión.
 - 5.9.5. Capacidad SPE.
 - 5.10. Informe de resultados.
 - 5.11. Normas de seguridad.
 - 5.12. Eliminación de los residuos.
 - 5.13. Responsables.
- 6.- ARCHIVO Y CONSERVACIÓN DE LA DOCUMENTACIÓN
- 7.- DOCUMENTACIÓN COMPLEMENTARIA
- 8.- DOCUMENTACIÓN QUE SUSTITUYE
- 9.- ÁREAS DE DISTRIBUCIÓN
- 10.- ANEXOS

MODIFICACIONES RESPECTO A LA EDICIÓN ANTERIOR

No aplica

Elaborado:	Revisado:	Aprobado:
O. Pindado Jiménez  Fecha: 24 / 3 / 2017	A.J. Quejido Cabezas Fecha:	J.M. Pérez Morales Fecha:

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 2 de 29

1.- OBJETO

El objetivo del presente procedimiento es determinar el contenido de Diésel que hay presente en un medio de cultivo con microorganismos mediante el empleo de GC/FID.

2.- CAMPO DE APLICACIÓN

Este procedimiento es aplicable a las muestras de medio de cultivo con microorganismos que utilizan el Diésel como fuente de carbono para su crecimiento. Se determinará el contenido del TPH, cinco rangos de hidrocarburos alifáticos y cinco rangos de hidrocarburos aromáticos.

- Hidrocarburos alifáticos comprendidos entre $>C_{10} - C_{12}$.
- Hidrocarburos alifáticos comprendidos entre $>C_{12} - C_{16}$.
- Hidrocarburos alifáticos comprendidos entre $>C_{16} - C_{21}$.
- Hidrocarburos alifáticos comprendidos entre $>C_{21} - C_{35}$.
- Hidrocarburos alifáticos comprendidos entre $>C_{35}$.
- Hidrocarburos aromáticos comprendidos entre $>C_{10} - C_{12}$.
- Hidrocarburos aromáticos comprendidos entre $>C_{12} - C_{16}$.
- Hidrocarburos aromáticos comprendidos entre $>C_{16} - C_{21}$.
- Hidrocarburos aromáticos comprendidos entre $>C_{21} - C_{35}$.
- Hidrocarburos aromáticos comprendidos entre $>C_{35}$.

3.- DOCUMENTACIÓN DE REFERENCIA

“Determinación de fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos en muestras de agua subterránea”. Procedimiento de trabajo QM-PT-TC-09. Edición 0.

“Evaluación del contenido de Diésel presente en un medio de cultivo”. Informe Técnico CIEMAT 1400, Marzo 2017.

4.- DEFINICIONES

Calibración: Es el conjunto de operaciones que establecen, bajo condiciones especificadas, la relación entre los valores de una magnitud (área del pico cromatográfico) y los valores correspondientes de esa magnitud realizados por patrones.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0

Capacidad cartucho: Es la cantidad de analitos (Diésel) que puede retener el adsorbente sin que se produzca la saturación.

EC: Número equivalente de carbono. Es una relación, definida empíricamente, entre el punto de ebullición de un compuesto y el punto de ebullición de un compuesto que se toma como referencia (*n*-hexano; EC = 6).

Factor de calibración: Es la relación entre el área cromatográfica y la cantidad de muestra inyectada.

Medio de cultivo: Es la técnica de laboratorio que tiene como objetivo generar un entorno controlado que favorezca el crecimiento microbiano. Está compuesto por un medio acuoso con sales inorgánicas que proporcionan los elementos necesarios, Diésel como fuente de carbono y un extracto de levadura.

Precisión: Dispersión de los valores obtenidos al realizar una serie de medidas repetitivas e independientes del método analítico.

Precisión intermedia: Se refiere a medida de la precisión del método analítico en condiciones diferentes de analista, día o equipo dentro del mismo laboratorio.

Rango de hidrocarburos: Se define como el conjunto de hidrocarburos alifáticos o aromáticos comprendidos entre un número determinado de átomos de carbono.

Repetibilidad: Es el grado de concordancia entre los resultados de sucesivas mediciones realizadas a una misma alícuota en las mismas condiciones del método analítico.

4.1. Siglas y acrónimos.

B(a)A: Benzo(a)antraceno.

B(a)Py: Benzo(a)pireno.

B(b)F: Benzo(b)fluoranteno.

B(ghi)Pe: Benzo(ghi)perileno.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 4 de 29

B(k)F: Benzo(k)fluoranteno.

DBA: Dibenzo(ah)antraceno.

DCM: Diclorometano.

FID: Flame Ionization Detector.

InPy: Indeno(123-cd)pireno.

PAHs: PolyAromatic Hydrocarbons.

RSD: Relative Standard Deviation.

SPE: Solid Phase Extraction.

TPH: Total Petroleum Hydrocarbons.

UCM: Unresolved Complex Mixture.

5.- DESCRIPCIÓN

5.1. Principio del método.

Consiste en determinar el contenido de Diésel (TPH y diferentes rangos de hidrocarburos) presente en muestras de medio de cultivo con microorganismos con el fin de evaluar el proceso de degradación mediante diferentes técnicas de bio-remediación.

El método analítico comienza con una centrifugación para separar los microorganismos presentes, seguido de una extracción en fase sólida en fase inversa para conseguir disponer los analitos en un disolvente apolar, para a continuación realizar un fraccionamiento de los hidrocarburos con cartuchos de fase normal y finalmente realizar el análisis mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0

5.2. Instrumentación, materiales y reactivos.

5.2.1. Instrumentación.

- › Cromatógrafo de gases Agilent 7820A con detector FID e inyector automático.
- › Distribuidor de vacío para SPE de 12 puertos [Agilent].
- › Bomba de vacío [Vacuubrand].
- › Centrífuga [Ortoalresa digito 21].
- › Balanza granataria [Sartorius TE2101]
- › Agitador tipo vortex.
- › Vitrina extractora.
- › Sistema de evaporación con corriente de nitrógeno.
- › Sistema de agua desionizada.

5.2.2. Materiales.

- › Columna cromatográfica de sílice fundida HP5 (30 m longitud; 0.32 mm diámetro interno; 0.25 μm fase estacionaria). *Nº serie: USA540816H.*
- › Cartuchos de fase inversa Waters Sep-pak tC₁₈ (6 cc / 1 g).
- › Cartuchos de fase normal Isolute sorbent EPH (25 cc / 5 g).
- › Jeringas de 25 μL , 50 μL , 100 μL , 250 μL , 500 μL , 1 mL y 2.5 mL [Hamilton y SGE].
- › Probetas de 10, 25, 100 y 250 mL.
- › Pipeta de 50 y 100 mL.
- › Tubos de centrifuga de 50 y 100 mL.
- › Viales de vidrio de 1, 5, 10 y 20 mL.
- › Tubos de ensayo.
- › Vasos de precipitados.
- › Pipetas Pasteur.
- › Adaptadores, tetinas, tapones y tuberías de Teflón.

5.2.3. Patrones, disolventes y gases.

- › Medio de cultivo mínimo.
- › Diésel.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	Edición: 0	
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Página: 6 de 29

- ▶ 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]. Detalles en el Anexo I.
- ▶ Patrón de hidrocarburos aromáticos. PAH-Mix9: disolución de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en ciclohexano [Dr. Ehrenstorfer GMBH]. Detalles en el Anexo I.
- ▶ Acetona, hexano, diclorometano y metanol de calidad cromatográfica [Aldrich].
- ▶ Agua desionizada.
- ▶ Sulfato de sodio anhidro [Merck].
- ▶ 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*”, para la concentración de los extractos y para el secado.

5.3. 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.

Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Volumen (μL) patrón impar 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Volumen (μL) patrón par 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Volumen (μL) Hexano
200	40	40	20
150	30	30	40
100	20	20	60
50	10	10	80
25		25 (patrón 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	75
5		5 (patrón 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	95

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.

Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Volumen (μL) patrón 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Volumen (μL) Hexano
100	100	-
80	80	20
60	60	40
40	40	60
20	20	80
1	5 (Patrón 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	95

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 7 de 29

5.4. Conservación y mantenimiento de las muestras.

Las disoluciones de calibrado se mantienen a 4 °C hasta su inyección. Se conservan como máximo 24 horas.

El laboratorio debe recibir las muestras de medio de cultivo, preferentemente cerradas en recipientes de vidrio ámbar y contener al menos 100 mL de muestra. Se mantienen a 4 °C hasta la realización del análisis.

5.5. Procedimiento de limpieza.

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

Se usa hexano y diclorometano (Volumen \approx 1–5 mL). El lavado se realiza dentro de una vitrina extractora. A continuación el material limpio se seca a temperatura ambiente.

5.6. Tratamiento de la muestra.

Todo el tratamiento que implique el uso de disolventes orgánicos se realiza dentro de una vitrina extractora. En la Figura I se presenta un esquema del procedimiento analítico necesario para analizar el diésel en un medio de cultivo.

Ciemat Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 8 de 29

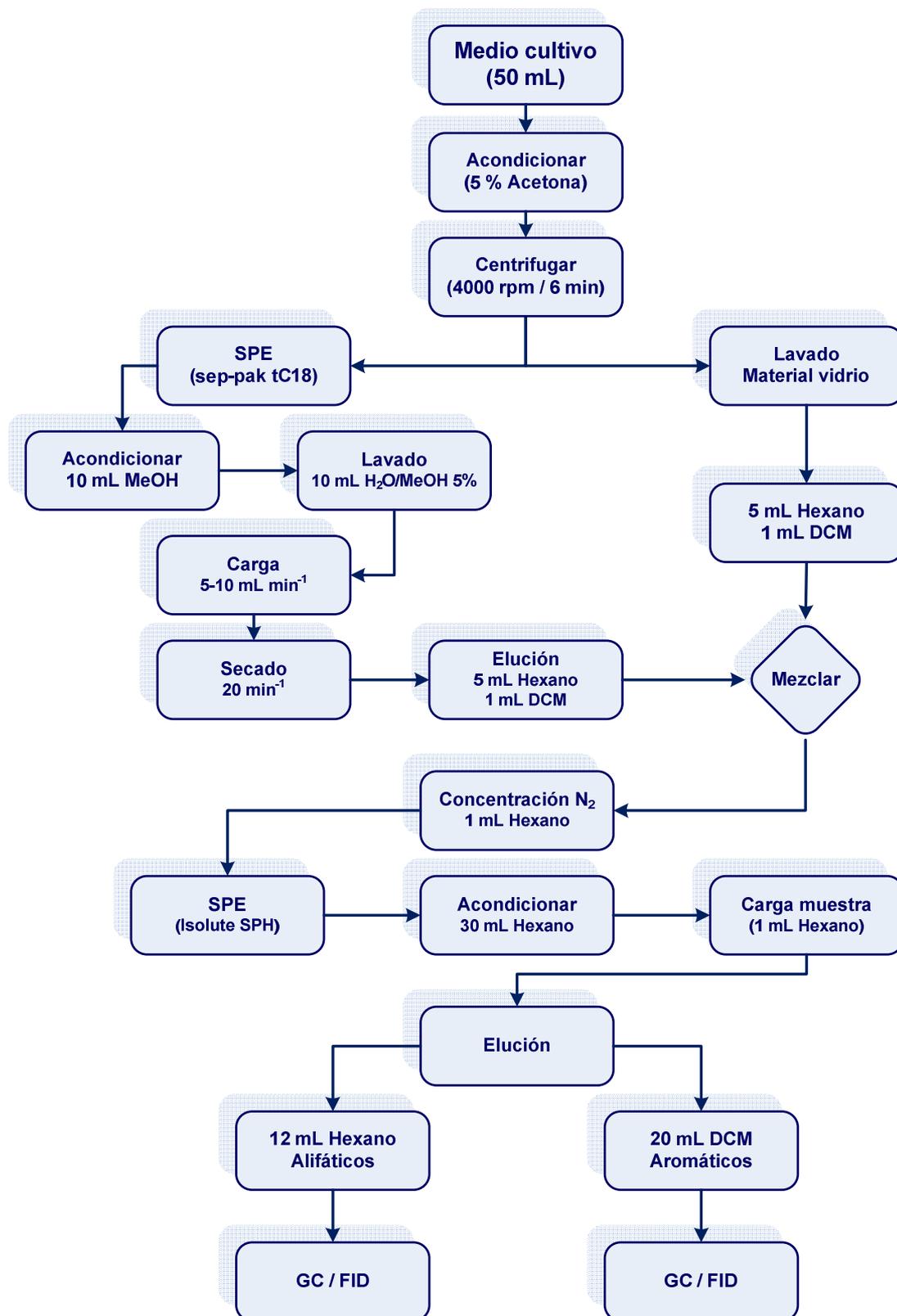


Figura I: Esquema del procedimiento analítico necesario para analizar el contenido de Diésel en medio de cultivo.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 9 de 29

5.6.1. Centrifugación.

Con una pipeta volumétrica se toman 50 mL del medio de cultivo y se depositan en un tubo de centrífuga de 100 mL. Para mejorar la recuperación de la extracción se añade 2.5 mL de acetona a la muestra, además se favorecerá la posterior separación de los microorganismos presentes.

Para realizar la centrifugación, los tubos de centrífuga con la muestra deben ser pesados en una balanza granataria para obtener el mismo valor que su contrapeso. Las muestras se centrifugan a 4000 rpm durante 6 minutos (Programa 6 / Nombre TPH) con un tiempo total del programa de centrifugado de 8 minutos y 40 segundos. Esta centrifugación aglutina los microorganismos presentes facilitando su posterior separación.

5.6.2. Extracción en fase sólida.

Se emplea un distribuidor de vacío conectado a una bomba de membrana. El distribuidor de vacío dispone de doce posiciones con llaves de teflón. El empleo de las llaves de teflón permitirá regular el caudal que pasa a través de los cartuchos conectados al distribuidor. Para evitar problemas a lo largo del proceso de SPE, todas las mezclas de disolventes orgánicos empleados deben estar preparadas antes de comenzar el proceso.

Se colocan los cartuchos *Waters sep pak tC18 (6cc/1g)* en las llaves del distribuidor de vacío. En el interior del distribuidor se coloca un vaso de precipitados de 250 mL para recoger la muestra que pasa por los cartuchos.

La primera etapa consiste en activar el adsorbente. La etapa de activación consiste en hacer pasar un disolvente orgánico fuerte. El empleo de 10 mL de MeOH es suficiente para empapar completamente el adsorbente. Una vez activado, se debe proceder a equilibrar el adsorbente y para ello se hacen pasar 10 mL de la mezcla agua/MeOH al 5%. Es imprescindible evitar que se seque el adsorbente durante estas etapas. Tanto para activar como para equilibrar los cartuchos se aplica vacío (presión de 5 pulgadas de Hg) regulando el caudal con las llaves de teflón.

A continuación, y sin dejar secar el adsorbente, comienza la etapa de carga de la muestra. Con ayuda de una pipeta Pasteur se va depositando el medio de cultivo en el cuerpo del cartucho. Gracias a la centrifugación se podrá coger el medio de cultivo evitando introducir las micelas de microorganismos en el cartucho y minimizando el taponamiento del adsorbente. Se conecta la bomba de vacío y se comienza a pasar la muestra a un caudal en torno a 5 mL min⁻¹. Para

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 10 de 29

conseguir este caudal se va ajustando la presión del distribuidor de vacío entre las 5 y 20 pulgadas de Hg. Una vez ha pasado todo el medio de cultivo se hace pasar 5 mL de agua desionizada para lavar el cartucho.

La siguiente etapa consiste en secar el adsorbente. Para ello se conecta el distribuidor de vacío (presión de 20 pulgadas de Hg) y se hace pasar aire por el cartucho durante 20 minutos. Esta etapa es fundamental para mejorar el rendimiento de la extracción, ya que se elimina completamente el agua retenida en el adsorbente sin producir pérdidas de los compuestos más volátiles.

La última etapa consiste en eluir los compuestos retenidos en el adsorbente. Para ello se debe pasar un disolvente orgánico por el cartucho. El empleo de 5 mL de hexano y a continuación 1 mL de diclorometano es suficiente para eluir el diésel retenido en el adsorbente. Se aplica un ligero vacío (5 pulgadas de Hg) para obtener un caudal de 1 mL min⁻¹.

Para evitar las trazas de agua es necesario añadir sulfato de sodio anhidro al eluato. Finalmente, éste se concentra con una ligera corriente de nitrógeno hasta 1 mL de hexano para proceder a su fraccionamiento.

Con este procedimiento se han concentrado los analitos 50 veces además de disponerlos en un medio orgánico. En la Figura II se presenta el esquema del procedimiento de extracción en fase sólida empleado.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0

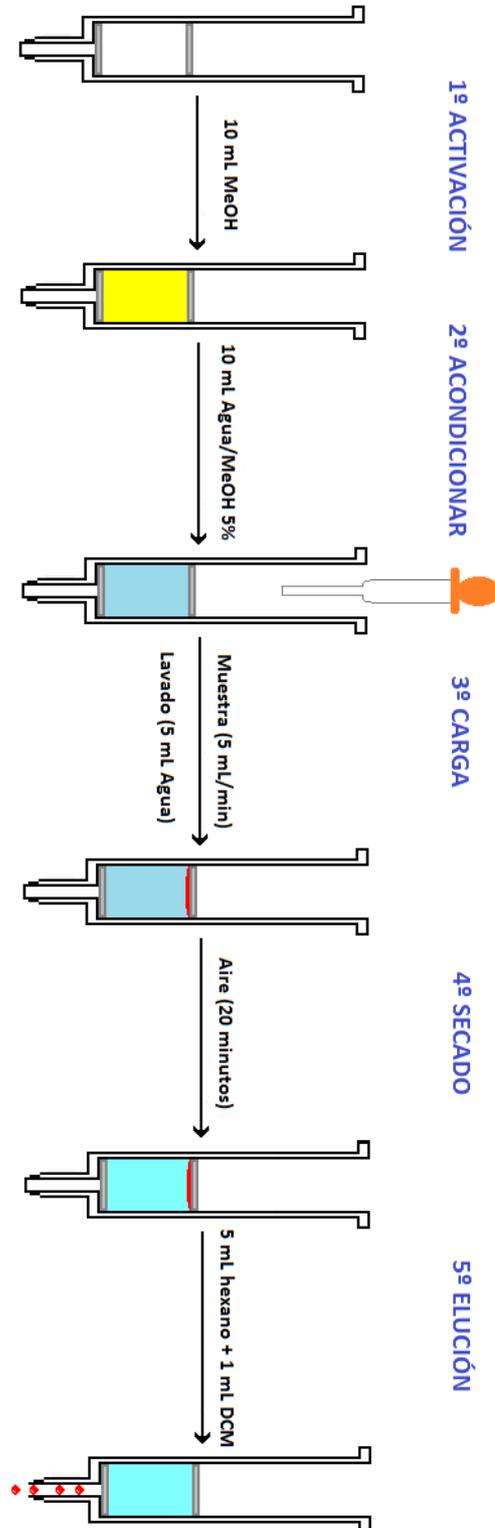


Figura II: Esquema de la extracción en fase sólida con cartuchos *Waters sep pak tC18*.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 12 de 29

5.6.3. Etapa de lavado.

Debido a las características de los analitos analizados, el material de vidrio que ha entrado en contacto con el medio de cultivo debe ser lavado para evitar que parte del diésel quede adsorbido sobre las paredes de los recipientes. El material de vidrio que debe lavarse siguiendo el siguiente protocolo es el recipiente que contenía el medio de cultivo, el tubo de centrífuga, la pipeta volumétrica y la pipeta Pasteur.

Se emplea 5 mL de hexano y 1 mL de DCM para lavar el material de vidrio. El disolvente orgánico se recoge en un vial de 10 mL y se añade sulfato de sodio anhidro. El disolvente orgánico libre de trazas de agua se concentra con una ligera corriente de nitrógeno y se junta con el eluato obtenido en la etapa de extracción en fase sólida.

5.6.4. Fraccionamiento mediante cartuchos de fase normal.

La etapa de fraccionamiento se realiza en un distribuidor de vacío sin necesidad de acoplar una bomba de membrana. Se emplean los cartuchos *Isolute* (25 cc / 5 g), que se colocan sobre las llaves de teflón. En el interior del cartucho se introduce un vaso de precipitados de 250 mL para recoger el disolvente orgánico empleado para activar los cartuchos. Para evitar errores durante el fraccionamiento se deben tener preparados todos los disolventes orgánicos antes de comenzar el procedimiento.

La primera etapa consiste en pasar un disolvente orgánico por el cartucho. Si el cartucho es nuevo, es necesario pasar 30 mL de hexano a través del adsorbente. Si el cartucho ya ha sido empleado, es necesario hacer pasar 60 mL de hexano (Los cartuchos pueden ser empleados dos veces sin perder la capacidad de fraccionamiento). El disolvente pasa por el cartucho por gravedad al abrir las llaves de teflón.

A continuación, y sin dejar secar el adsorbente, comienza la etapa de carga de la muestra. Esta consiste en depositar la muestra, disuelta en 1 mL de hexano, en la parte superior del lecho. Se abre la llave de teflón y por gravedad la muestra se introduce en el cartucho.

A continuación se retira el vaso de precipitado que tiene el disolvente empleado para activar los cartuchos y se introducen los viales que recogerán la muestra fraccionada.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 13 de 29

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.

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.

En la Figura III se presenta el esquema del procedimiento de fraccionamiento empleado.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0

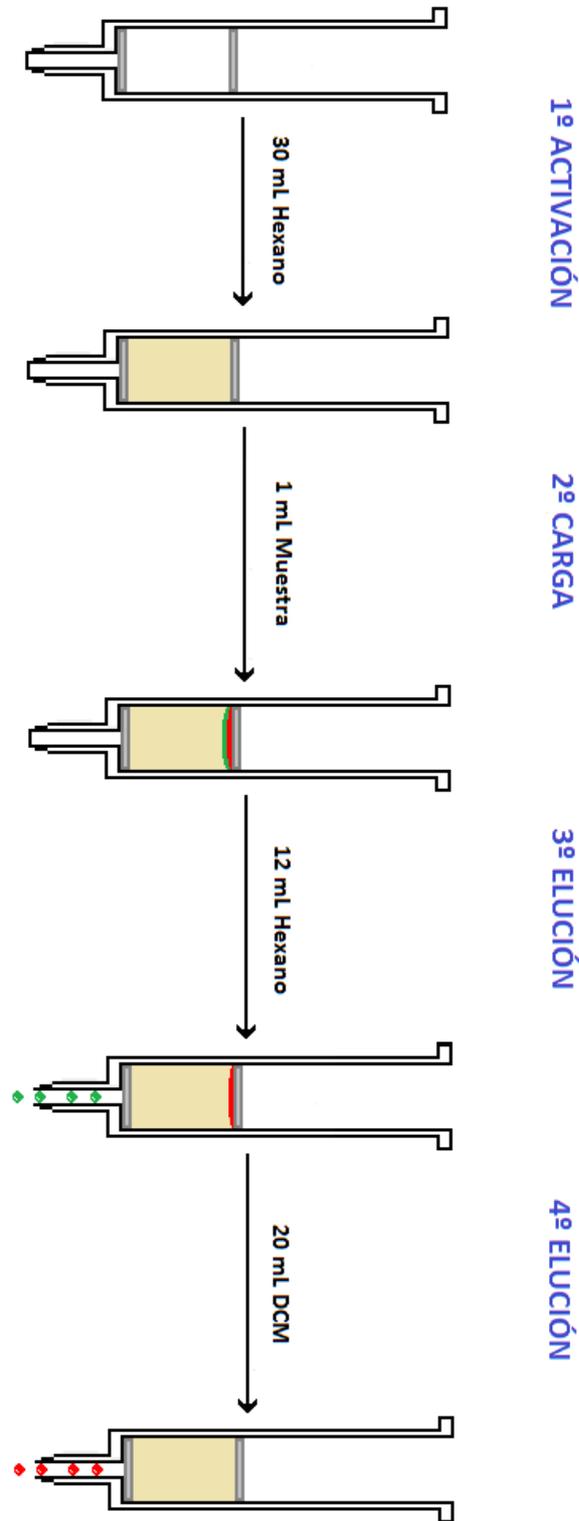


Figura III: Esquema del fraccionamiento con cartuchos ISOLUTE.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 15 de 29

5.7. Análisis cromatográfico.

5.7.1. Condiciones de operación.

Para el análisis de los hidrocarburos alifáticos se definen las condiciones óptimas de operación. En la Tabla III se presentan las condiciones cromatográficas utilizada para el análisis de estos compuestos.

Tabla III: Condiciones óptimas de operación para el análisis del Diésel.

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
3 µL muestra + 0.2 µL aire	(3) 11 °C min ⁻¹	300 °C 17 min.	N ₂ : 25 mL min ⁻¹

5.7.2. Definición del rango de hidrocarburos

El primer paso para definir los rangos de hidrocarburos consiste en identificar, mediante el tiempo de retención, diferentes hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Para establecer precisamente los tiempos de retención de cada compuesto se realizan varias inyecciones de patrones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos a diferentes concentraciones. 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 procedimiento están recogidos en las Tablas IV y V.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	Edición: 0	
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Página: 16 de 29

Tabla IV: Ventana de tiempos de retención de los hidrocarburos alifáticos [t_R promedio \pm 3s].

Compuesto	t_R (min)	Compuesto	t_R (min)	Compuesto	t_R (min)
<i>Decano</i>	3,425 \pm 0,012	<i>Nonadecano</i>	17,290 \pm 0,043	<i>Triacotano</i>	26,428 \pm 0,034
<i>Undecano</i>	4,654 \pm 0,017	<i>Eicosano</i>	18,554 \pm 0,037	<i>Hentriacotano</i>	27,085 \pm 0,041
<i>Dodecano</i>	6,166 \pm 0,023	<i>Heneicosano</i>	19,652 \pm 0,034	<i>Dotriacotano</i>	27,828 \pm 0,047
<i>Tridecano</i>	7,828 \pm 0,030	<i>Docosano</i>	20,633 \pm 0,033	<i>Tritriacotano</i>	28,680 \pm 0,058
<i>Tetradecano</i>	9,527 \pm 0,031	<i>Tricosano</i>	21,524 \pm 0,030	<i>Tetraacotano</i>	29,677 \pm 0,059
<i>Pentadecano</i>	11,202 \pm 0,036	<i>Tetracosano</i>	22,347 \pm 0,032	<i>Pentacotano</i>	30,855 \pm 0,081
<i>Hexadecano</i>	12,824 \pm 0,038	<i>Pentacosano</i>	23,114 \pm 0,031	<i>Hexacotano</i>	32,260 \pm 0,097
<i>Heptadecano</i>	14,380 \pm 0,043	<i>Hexacosano</i>	23,840 \pm 0,033	<i>Heptacotano</i>	33,939 \pm 0,098
<i>Pristano</i>	14,480 \pm 0,044	<i>Heptacosano</i>	24,529 \pm 0,031	<i>Octacotano</i>	35,962 \pm 0,103
<i>Octadecano</i>	15,869 \pm 0,044	<i>Octacosano</i>	25,186 \pm 0,032	<i>Nonacotano</i>	38,402 \pm 0,124
<i>Fitano</i>	16,011 \pm 0,047	<i>Nonacosano</i>	25,817 \pm 0,032	<i>Tetraacotano</i>	41,358 \pm 0,154

Tabla V: Ventana de tiempos de retención de los hidrocarburos aromáticos [t_R promedio \pm 3s].

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

Se definen los rangos de hidrocarburos alifáticos en función del número de átomos de carbono de la cadena alifática. En la Tabla VI 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 VI: Definición de los rangos de hidrocarburos alifáticos.

Rango hidrocarburos alifáticos	Tiempo de Inicio (min)	Tiempo final (min)
>C ₁₀ -C ₁₂	4,2	7,0
>C ₁₃ -C ₁₆	7,0	13,5
>C ₁₇ -C ₂₁	13,5	20,2
>C ₂₂ -C ₃₅	20,2	31,0
>C ₃₅	31,0	43,2

Para definir los rangos de hidrocarburos aromáticos se emplea el EC. En la Tabla VII se resumen los valores para cada hidrocarburo aromático.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	Edición: 0	
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Página: 17 de 29

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

Compuesto	P.E. (°C)*	Carbonos	EC	Compuesto	P.E. (°C)*	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 VIII.

Tabla VIII: Definición de los rangos de hidrocarburos aromáticos.

Rango hidrocarburos aromáticos	Tiempo de Inicio (min)	Tiempo final (min)
>EC ₁₀ -EC ₁₂	4,0	6,5
>EC ₁₃ -EC ₁₆	6,5	12,5
>EC ₁₇ -EC ₂₁	12,5	20,0
>EC ₂₂ -EC ₃₅	20,0	27,0
>EC ₃₅	27,0	42,2

5.7.3. Cuantificación de los rangos de hidrocarburos.

La cuantificación de los rangos de hidrocarburos y el valor de TPH 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.

La Eq. (1) recoge la expresión para calcular el factor de calibración para cada rango de hidrocarburo:

$$FC(Rango) = \frac{\sum A}{C}$$

Eq. (1)

Donde A es el área cromatográfica y C es la concentración total inyectada ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en ese rango. La concentración total inyectada no es igual en todos los rangos ya que cada rango incluye un número diferente de compuestos. En las Tablas IX y X se especifica la concentración

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	Edición: 0	
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Página: 18 de 29

inyectada en cada uno de los rangos de hidrocarburos al analizar las disoluciones de calibrado descritas en el punto 5.3. de este procedimiento.

Tabla IX: Concentraciones de hidrocarburos alifáticos presentes en cada rango.

Rango	n	Concentración total inyectada ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
		5	25	50	100	150	200
>C ₁₀ -C ₁₂	2	10	50	100	200	300	400
>C ₁₂ -C ₁₆	4	20	100	200	400	600	800
>C ₁₆ -C ₂₁	7	35	175	350	700	1050	1400
>C ₂₁ -C ₃₅	14	70	350	700	1400	2100	2800
>C ₃₅	5	25	125	250	500	750	1000

Tabla X: Concentraciones de hidrocarburos aromáticos presentes en cada rango.

Rango	n	Concentración total inyectada ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
		100	80	60	40	20	1
>EC ₁₀ -EC ₁₂	2	100	80	60	40	20	1
>EC ₁₂ -EC ₁₆	4	200	160	120	80	40	2
>EC ₁₆ -EC ₂₁	7	500	400	300	200	100	5
>EC ₂₁ -EC ₃₅	14	500	400	300	200	100	5
>EC ₃₅	5	300	240	180	120	60	3

La integración de los cromatogramas que se realiza es a "línea base". El factor de calibración de cada uno de los rangos se calcula como la media de los factores de calibración obtenidos en las 6 disoluciones inyectadas. Los resultados obtenidos están recogidos en la Tabla XI.

Tabla XI: Factores de calibración de los rangos de hidrocarburos.

Rango	FC	RDS (%)
Hidrocarburos alifáticos	507241	3
>C ₁₀ -C ₁₂	507809	6
>C ₁₂ -C ₁₆	509975	5
>C ₁₆ -C ₂₁	487752	5
>C ₂₁ -C ₃₅	333553	15
>C ₃₅		
Hidrocarburos aromáticos		
>EC ₁₀ -EC ₁₂	585134	4
>EC ₁₂ -EC ₁₆	591750	5
>EC ₁₆ -EC ₂₁	578406	4
>EC ₂₁ -EC ₃₅	569131	4
>EC ₃₅	420488	3

Los cromatogramas de una disolución de hidrocarburos alifáticos de $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y de una disolución de hidrocarburos aromáticos de $60\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ están recogidos en el Anexo II.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 19 de 29

5.8. Cálculo de resultados.

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

$$Conc(mg \cdot L^{-1}) = \frac{A}{FC}$$

Eq. (2)

La concentración de los rangos de hidrocarburos en el medio de cultivo se proporcionará con una cifra decimal como mg de analito por litro, de acuerdo a la Eq. (3):

$$Conc(mg \cdot L^{-1}) = \frac{A \times V_f (mL) \times 10^{-3}}{FC \times V_m(L)}$$

Eq. (3)

Donde V_f es el volumen de la alícuota inyectada en el GC-FID (normalmente 1 mL) y V_m es el volumen de muestra analizada (normalmente 50 mL).

El valor de TPH se calcula como la suma de los rangos de hidrocarburos alifáticos y aromáticos de acuerdo a la Eq. (4):

$$TPH(mg \cdot L^{-1}) = \sum [> C_{10} - C_{12}] + \dots + [> EC_{35}]$$

Eq.(4)

5.9. Control de calidad.

5.9.1. Intervalo dinámico lineal.

La linealidad ha sido demostrada mediante el cálculo de los factores de calibración, los cuales determinan la relación entre la señal del detector y la concentración de analito inyectada. Las disoluciones de concentración más baja y más elevada de los calibrados de hidrocarburos alifáticos y aromáticos definen el intervalo de trabajo. Los resultados obtenidos están recogidos en la Figura IV.

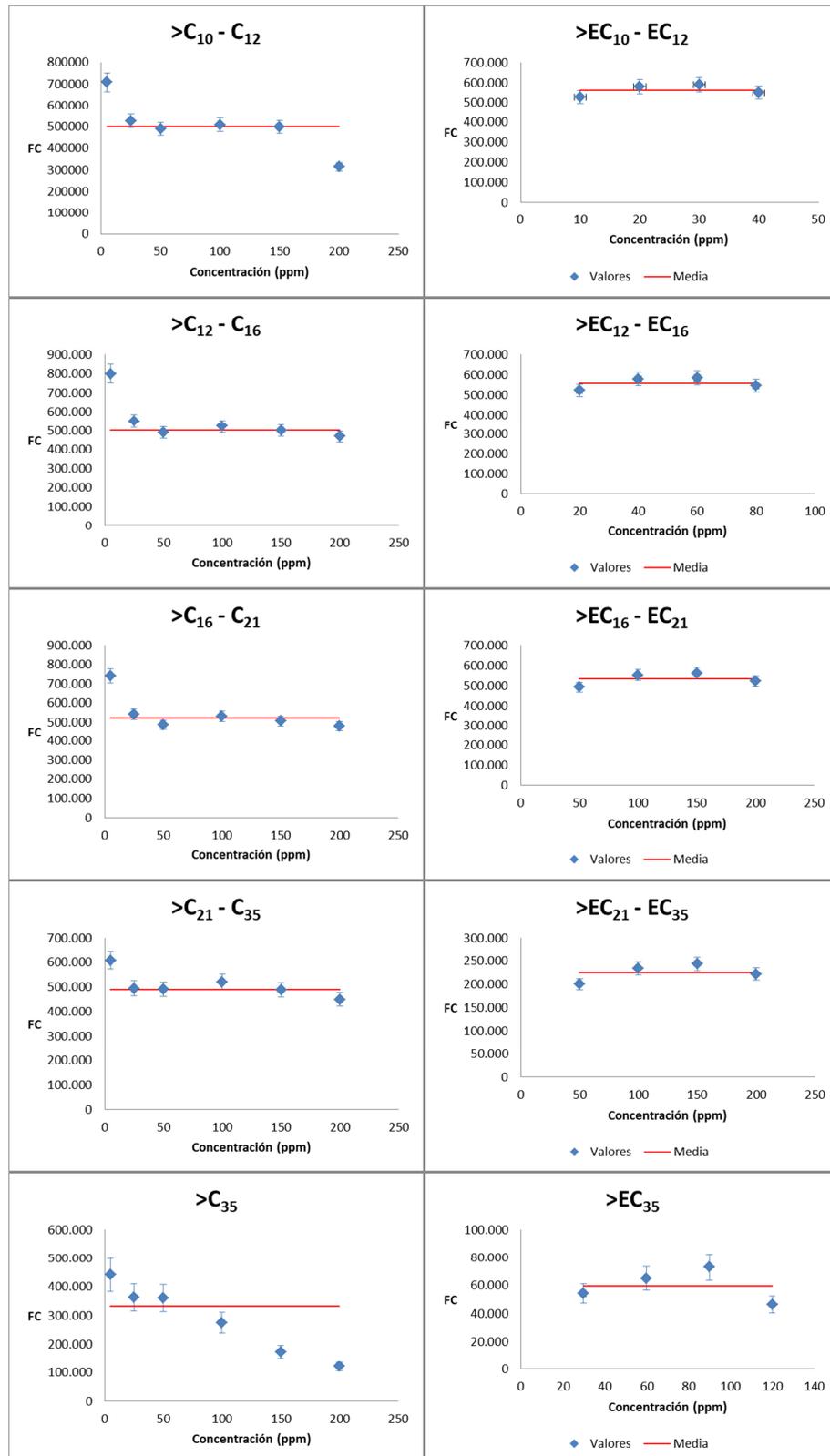


Figura IV: Linealidad calculada mediante la determinación de los FC de cada rango de hidrocarburos a diferentes concentraciones.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 21 de 29

5.9.2. Recuperación.

Para determinar la recuperación del procedimiento se analizan 8 alícuotas de medio de cultivo con una concentración de 1000 mg L⁻¹ de Diésel. Los resultados de cada rango se recogen en el Anexo III de este procedimiento.

De acuerdo a los resultados obtenidos se establece, con un 95 % de confianza, que la recuperación del Diésel, expresado como TPH, presente en un medio de cultivo de microorganismos se encuentra comprendida entre el 64 – 75 % con una desviación estándar de entre 5 – 14%.

5.9.3. Precisión.

La precisión es el grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo unas condiciones establecidas. Un estimador de la precisión es la desviación estándar relativa (*RSD*). La repetibilidad es una medida de dispersión interna y estima los errores aleatorios del método, mientras que la precisión intermedia evalúa cómo evoluciona una muestra con el tiempo.

Se preparan varias alícuotas de medio de cultivo con una concentración total de Diésel de 1000 µg mL⁻¹. La repetitividad se calcula como la *RSD* obtenida al analizar consecutivamente 4 alícuotas del medio de cultivo, mientras que para calcular la precisión intermedia se estudiará la *RSD* obtenida al analizar durante una semana 11 alícuotas de medio de cultivo. Los resultados obtenidos están recogidos en el Anexo III.

5.9.5. Capacidad SPE.

La capacidad del cartucho de SPE se define como la cantidad de diésel que puede retener el adsorbente sin que se produzca la saturación de éste. Para calcular la capacidad del cartucho se analizan 7 alícuotas de medio de cultivo con diferentes concentraciones de Diésel que oscilan entre 100 – 10000 mg L⁻¹. Los resultados están recogidos en la Figura V.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 22 de 29

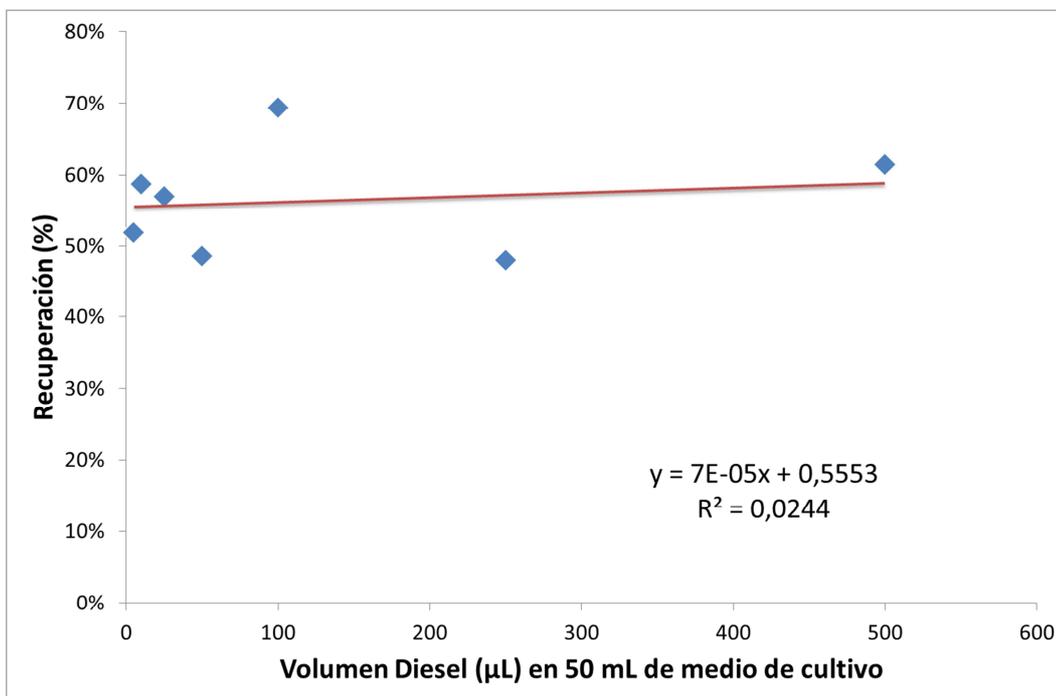


Figura V: Capacidad del cartucho *Sep-pak* para retener Diésel.

Los resultados muestran que la recuperación obtenida no disminuye al aumentar la cantidad de Diésel presente en el medio de cultivo que pasa por el cartucho, lo que indica que no se ha llegado a la capacidad del cartucho. Así pues, la capacidad del cartucho para retener Diésel es superior a 10000 mg L⁻¹.

5.10. Informe de resultados.

La concentración final de todos los rangos de hidrocarburos y el valor total de TPH se debe expresar en mg L⁻¹, sin especificar cifras decimales.

5.11. Normas de seguridad.

Todo el tratamiento de la muestra debe realizarse dentro de una vitrina extractora.

El personal debe estar equipado con equipos de protección individual (bata de laboratorio, guantes y gafas de seguridad).

Eliminar los residuos generados de acuerdo con el apartado 5.12.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 23 de 29

5.12. Eliminación de los residuos.

Los residuos líquidos se depositan en bidones, debidamente etiquetados, suministrados por el personal especializado del CIEMAT como residuos orgánicos tóxicos y/o peligrosos.

Los residuos generados en cada muestra analizada son: 20 mL de disolventes orgánicos y 250 mL de agua.

5.13. Responsables.

Las muestras deben llegar al laboratorio en las condiciones descritas en el apartado 5.4.

Un titulado superior, licenciado en ciencias o equivalente, responsable del cumplimiento global del procedimiento y de la gestión muestras dentro del laboratorio.

Un analista instrumental con formación de FP II o equivalente, responsable de las labores de recepción y análisis de las muestras.

6.- ARCHIVO Y CONSERVACIÓN DE LA DOCUMENTACIÓN

Este documento estará disponible en la Unidad de Cromatografía junto con los diferentes procedimientos de análisis. Asimismo estará disponible en la Jefatura de la División de Química del CIEMAT.

7.- DOCUMENTACIÓN COMPLEMENTARIA

No procede.

8.- DOCUMENTACIÓN QUE SUSTITUYE

No procede.

9.- ÁREAS DE DISTRIBUCIÓN

Unidad de Cromatografía y Dirección de la División de Química del CIEMAT.

10.- ANEXOS

» Anexo I: Patrones originales.

Tabla A: Patrón hidrocarburos alifáticos DRH-FTRPH-SET.

Tabla B: PAH-Mix 9. Lote 80725CY.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0 Página: 24 de 29

› **Anexo II: Cromatogramas.**

Figure A: Cromatograma disolución de hidrocarburos alifáticos de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Figure B: Cromatograma disolución de hidrocarburos aromáticos de $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

› **Anexo III: Control de calidad.**

Tabla C: Recuperación obtenida en el análisis de 8 alícuotas de medio de cultivo con Diésel.

Tabla D: Repetitividad y precisión intermedia del análisis de medio de cultivo con Diésel.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	Edición: 0	
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Página: 25 de 29

ANEXO I

Tabla A: Patrón hidrocarburos alifáticos DRH-FTRPH-SET.

Hidrocarburo	# CAS	Concentración (mg L ⁻¹)
Decano	124-18-5	497,6
Undecano	1120-21-4	495,0
Dodecano	112-40-3	499,8
Tridecano	629-50-5	497,0
Tetradecano	629-59-4	491,6
Pentadecano	629-62-9	496,7
Hexadecano	544-76-3	497,1
Heptadecano	629-78-7	496,2
Pristano	1921-70-6	495,8
Octadecano	593-45-3	500,4
Fitano	638-36-8	498,6
Nonadecano	629-92-5	496,2
Eicosano	112-95-8	499,1
Heneicosano	629-94-7	501,1
Docosano	629-97-0	495,8
Tricosano	638-67-5	495,3
Tetracosano	646-31-3	500,3
Pentacosano	629-99-2	499,0
Hexacosano	630-01-3	500,3
Heptacosano	593-49-7	500,6
Octacosano	630-02-4	499,5
Nonacosano	630-03-5	501,0
Triacotano	638-68-6	498,6
Hentriacotano	630-04-6	496,6
Dotriacotano	544-85-4	493,0
Tritriacotano	630-05-7	499,1
Tetrtriacotano	14167-59-0	499,4
Pentatriacotano	630-07-9	501,0
Hexatriacotano	630-06-8	494,1
Heptatriacotano	7194-84-5	501,2
Octatriacotano	7197-85-6	500,1
Nonatriacotano	7194-86-7	500,3
Tetracontano	4181-95-7	498,0

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	Edición: 0	
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Página: 26 de 29

Tabla B: PAH-Mix 9. Lote 80725CY.

Compuesto	CAS #	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Naftaleno	91-20-3	99,8
Acenaftileno	208-96-8	98,0
Acenafteno	83-32-9	99,5
Fluoreno	86-73-7	99,0
Fenantreno	85-01-8	99,0
Antraceno	120-12-7	99,5
Fluoranteno	206-44-0	99,5
Pireno	129-00-0	99,5
Benzo (a) antraceno [B(a)A]	56-55-3	99,0
Criseno	218-01-9	99,0
Benzo (b) fluoranteno [B(b)F]	205-99-2	99,5
Benzo (k) fluoranteno [B(b)F]	207-08-9	99,0
Benzo (a) pireno [B(a)P]	50-32-8	98,5
Indeno (123 cd) pireno [InPy]	193-39-5	99,0
Dibenzo (ah) antraceno [DBA]	53-70-3	99,0
Benzo (ghi) perileno [B(ghi)Pe]	191-24-2	99,5

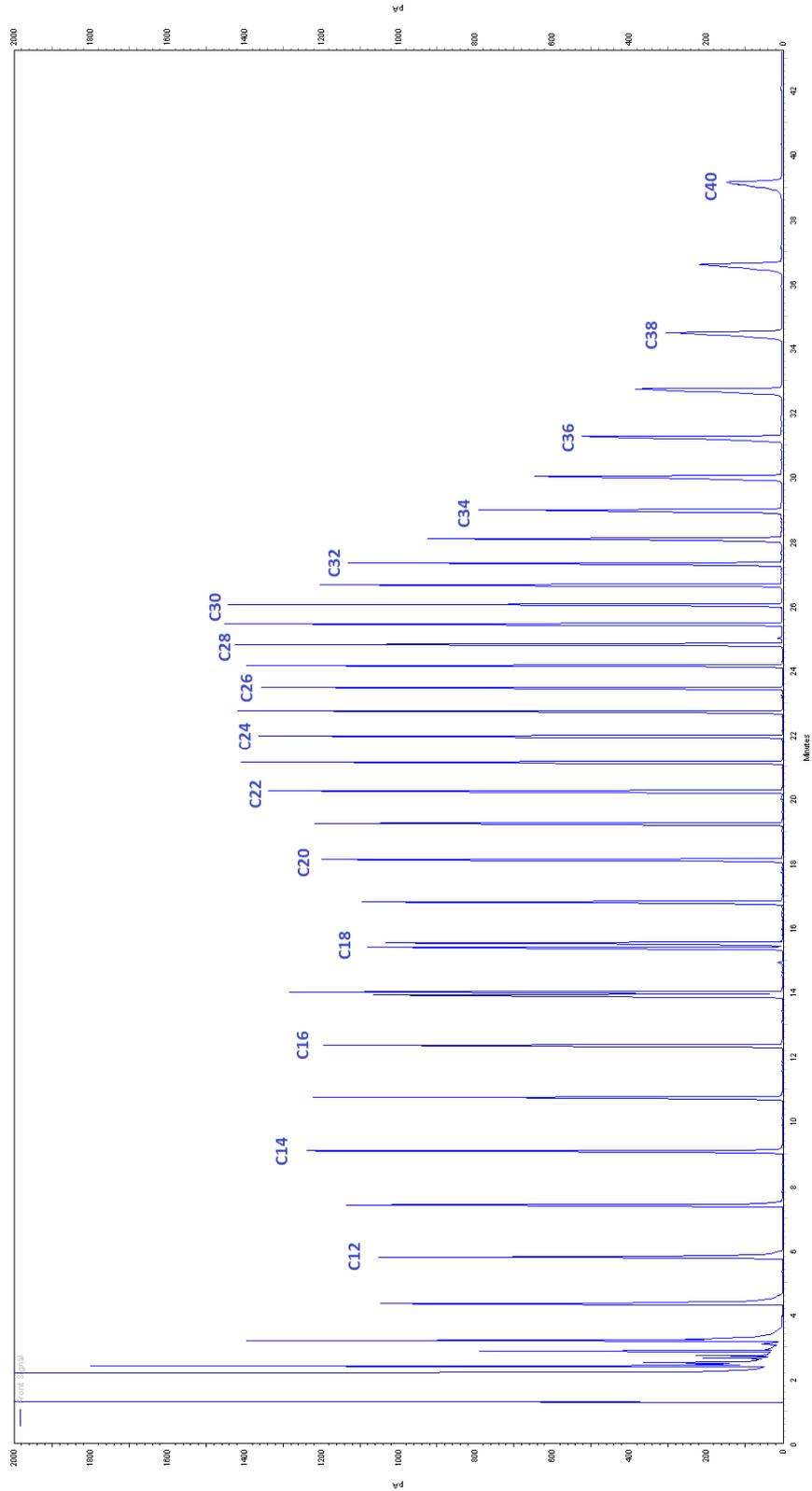
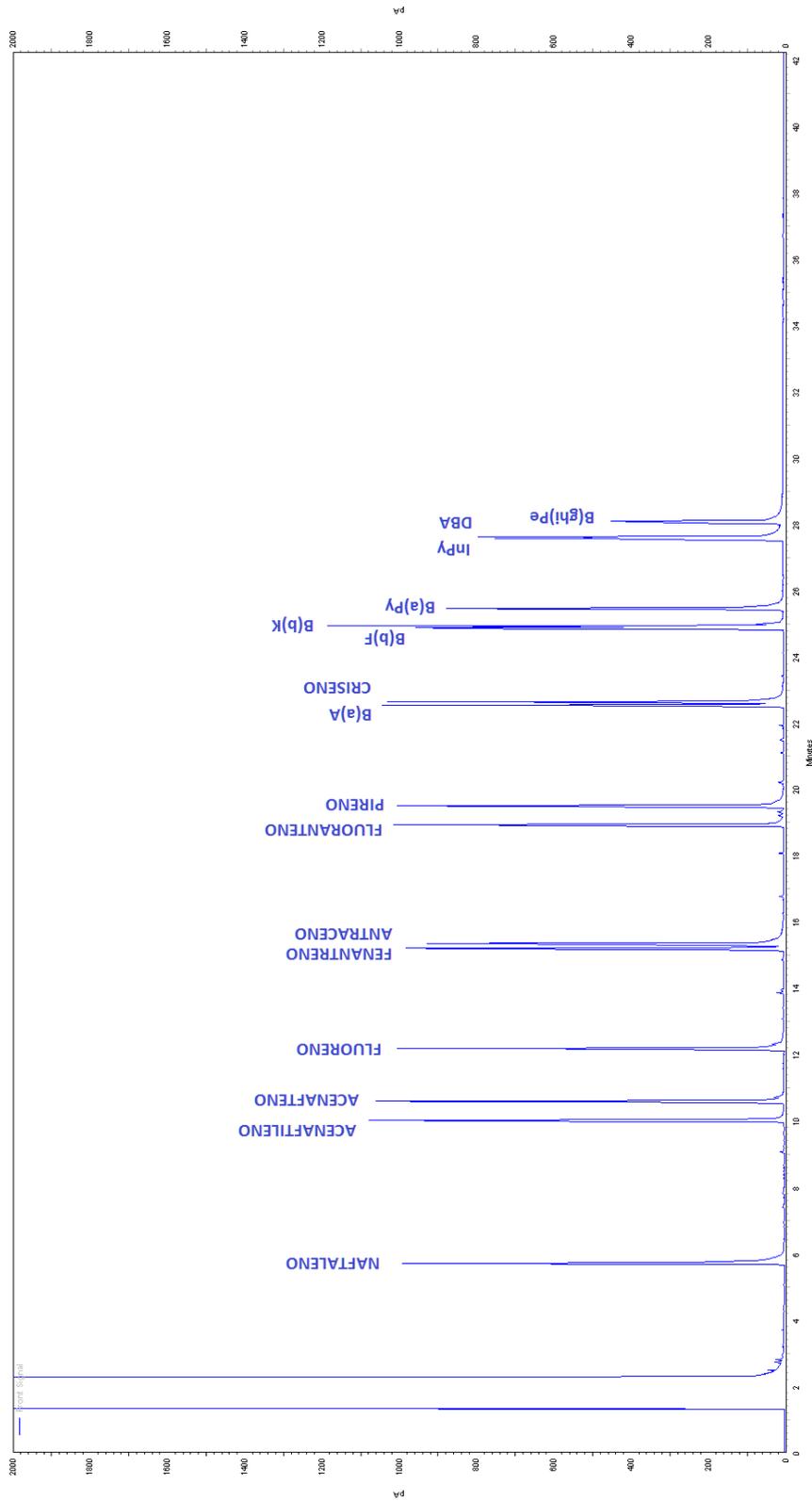
ANEXO II**Figura A:** Cromatograma disolución de hidrocarburos alifáticos de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Figura B: Cromatograma disolución de hidrocarburos aromáticos de $60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

 Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas	DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DIVISIÓN DE QUÍMICA (DQ)	Código: QM-PT-TC-12
	TIPO PROCEDIMIENTO Determinación de Diésel en un medio de cultivo de microorganismos	Edición: 0
		Página: 29 de 29

ANEXO III

Tabla C: Recuperación obtenida en el análisis de 8 alícuotas de medio de cultivo con Diésel.

	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	(H)	Media
>C ₁₀ - C ₁₂	43	58	61	63	57	72	64	70	61
>C ₁₂ - C ₁₆	57	69	68	71	67	79	69	79	70
>C ₁₆ - C ₂₁	62	72	71	75	69	81	70	81	73
>C ₂₁ - C ₃₅	64	74	72	76	70	85	71	83	74
>C ₃₅	123	121	120	116	121	122	107	118	119
TOTAL	57	69	68	71	66	79	68	79	70

Tabla D: Repetitividad y precisión intermedia del análisis de medio de cultivo con Diésel.

	Repetitividad (n=4) RDS (%)	Precisión intermedia (n=11= RDS (%)
>C ₁₀ - C ₁₂	1	8
>C ₁₂ - C ₁₆	2	6
>C ₁₆ - C ₂₁	3	5
>C ₂₁ - C ₃₅	3	5
>C ₃₅	3	6
TOTAL	2	6