

Extracción y Análisis de Muestras de Petróleo

# Técnicas analíticas: identificación de familias de compuestos

En este artículo se estudian las técnicas más utilizadas para el análisis de compuestos orgánicos (petróleo) en muestras sólidas y líquidas. Se describirá más detenidamente la técnica de "Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas" por ser muy útil en la identificación de compuestos individuales.

In this paper, the most used techniques for organic compounds (oil) analysis in solid and liquid samples are studied. The "Gas Chromatography – Mass Spectrometry" technique will be described in more detail because of its usefulness in the individual compounds identification.

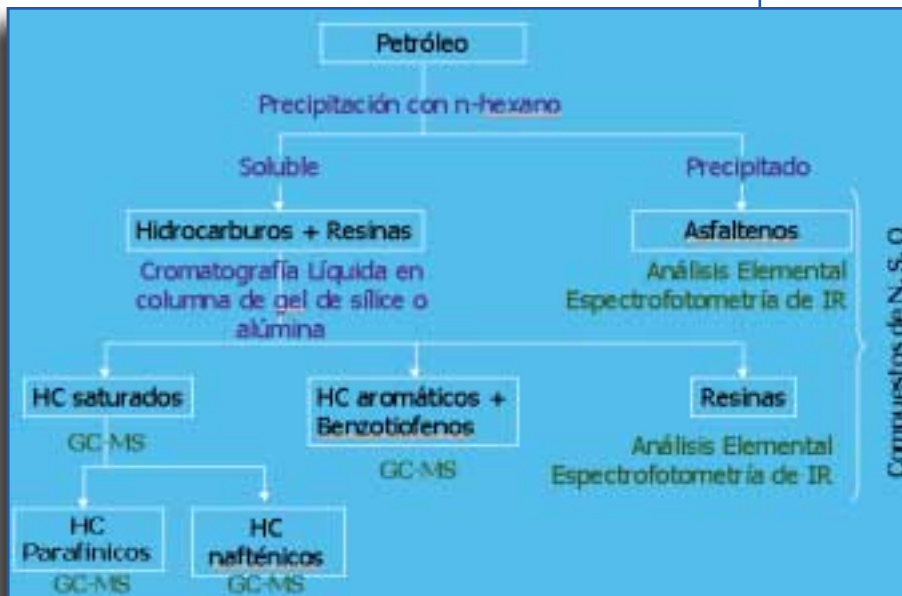
## Introducción

Antes de comenzar con los métodos de análisis propiamente dichos, es importante tener unas ligeras nociones acerca de cómo se ha de recoger y almacenar la muestra hasta su momento de análisis. Esta consideración, que a menudo se pasa por alto, es muy importante, dado que si no se hace de for-

ma correcta, la muestra que analicemos al final no va a ser representativa de nuestro problema y no nos va a ser útil.

Los métodos de análisis que vamos a estudiar van a estar referidos al análisis de compuestos orgánicos, por lo que todas las muestras que se recojan han de guardarse en recipientes de vidrio, dado que los recipientes

Esquema 1.  
Distintas fracciones y técnicas de análisis de una muestra de petróleo.



de plástico (botes, bolsas) contaminan la muestra debido a que contienen productos orgánicos. También es muy importante conservar las muestras a una temperatura igual o inferior a 4 °C. De esta forma, estamos inhibiendo la actividad de las bacterias que, de otro modo, estaría variando la composición de nuestra muestra, tanto más cuanto más tiempo pase entre la recogida y el análisis de la muestra. Esto es especialmente necesario hacerlo en estudios de biorremediación en los que precisamente se estudia la capacidad que tienen estas bacterias para degradar los compuestos que vamos a analizar.

En el esquema 1 aparecen los distintos tipos de análisis más utilizados para determinar los constituyentes de una muestra de petróleo. En ningún momento se va a hacer referencia a volátiles, dado que se supone que las muestras que estamos recogiendo han perdido ya prácticamente todos los volátiles (que han sido liberados a la atmósfera). De todas formas si se quieren estudiar se podría hacer un análisis por *headspace* o *espacio en cabeza*, que consistiría en coger la muestra de hidrocarburo, meterla dentro de un frasco que tuviera una membrana de silicona en la parte superior, cerrar bien el frasco y cuando se llega al laboratorio se pincharía sobre esta membrana de silicona y se extraerían así los gases, sin necesidad de abrir el frasco.

En este artículo se van exponer los métodos más utilizados para la extracción y análisis de muestras de petróleo, es decir, todos los pasos que hay que dar, des-

de que una muestra llega al laboratorio, hasta que obtenemos la información acerca de la composición de la misma.

Lo primero que hay que tener en cuenta cuando hablamos de petróleo es que bajo este término englobamos a una serie de familias de productos que tienen distintas propiedades físicas y químicas y que una vez liberadas en el medio natural, tienden a separarse. Unas familias tienden a disolverse, otras a sobrenadar y otras a precipitar.

El petróleo está constituido por una fase gaseosa (compuesta fundamentalmente por hidrocarburos de bajo peso molecular: metano, etano, propano, butano...) y por una fase líquida (compuesta por hidrocarburos con más de cinco átomos de carbono). En este artículo nos vamos a centrar en el análisis de la fase líquida.

Dentro de esta parte líquida del petróleo, encontramos tres fracciones principales: los asfaltenos, las resinas y los hidrocarburos. Los asfaltenos y las resinas son compuestos pesados que contienen N, S y/o O (peso molecular > 500), mientras que los hidrocarburos son moléculas con menor peso molecular.

La forma de analizar estos petróleos se basa en separarlos en distintas fracciones, correspondientes a los tipos estructurales principales. Para ello, y como veremos más adelante, se utiliza hexano, para disolver todas las fracciones (a esta fracción disuelta se le denomina maltenos), menos la de los asfaltenos, que va a precipitar. Mediante cromatografía líquida (que estudiaremos más adelante) vamos a ser capaces de separar el resto de las fracciones (maltenos) en una fracción alifática, otra aromática y por otro lado las resinas:

- Los hidrocarburos saturados comprenden alcanos normales y ramificados (de-

nominados parafinas) y cicloalcanos (naftenos).

- Los hidrocarburos aromáticos incluyen compuestos puros aromáticos, moléculas cicloalcanoaromáticas y compuestos cíclicos del azufre.

Estas dos fracciones se suelen analizar con cromatografía de gases-espectrometría de masas que es la técnica más utilizada en este tipo de estudios para controlar la biodegradación de los hidrocarburos.

Las resinas y los asfaltenos están constituidos por fracciones de alto peso molecular que contienen átomos de N, S y O. Los asfaltenos son insolubles en alcanos ligeros, de ahí que precipiten con el hexano. Las resinas son más solubles, pero, al mismo tiempo, son muy polares y suelen quedarse retenidas en la alúmina cuando se realiza la cromatografía líquida, o necesitan utilizar disolventes muy polares como el metanol para su liberación de la alúmina. El hecho de que sean fracciones que contengan compuestos con alto peso molecular, implica que no se van a poder analizar mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, por lo que se recurre a la utilización de otras técnicas, como pueden ser el análisis elemental y la espectrofotometría de infrarrojos.

Tabla I.  
Composición química general de una muestra del fuel del Prestige tomado el 18/11/02 por el Ailette en una mancha en el mar (Fuente Cedre, 2002).

Es muy importante tener en cuenta que estos cuatro parámetros no son independientes, ya que los petróleos consisten en estos cuatro grupos de compuestos. Normalmente, a medida que se van obteniendo cada una de estas fracciones de com-

puestos, se suele eliminar el disolvente y pesar la cantidad de compuestos que hay en cada una de las fracciones, obteniéndose los porcentajes relativos de cada una de las fracciones.

Por ejemplo, en el caso de una muestra del fuel del **Prestige** tomada en una mancha sobre la superficie del mar, obtendríamos la siguiente composición (ver tabla I).

A partir de los resultados de la tabla I, se deduce que se puede obtener información aproximadamente del 70% de los compuestos presentes en una muestra, mediante el análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Para los compuestos más pesados, tendríamos que recurrir a otras técnicas analíticas, como la Espectroscopía de Infrarrojos, que se basa en el estudio de los enlaces de las moléculas.

El hecho de que nos centremos en la Cromatografía de gases – Espectrometría de masas es debido a que es una técnica analítica muy potente, que proporciona muchísima información a partir de muy poca cantidad de muestra y que es de vital importancia en el estudio de las técnicas de biorremediación. Esta importancia radica, como se verá más adelante, en que se va a poder tener información acerca de la eficiencia con la que distintos microorganismos son capaces de degradar los hidrocarburos.

Vamos a empezar viendo las técnicas de análisis que se utilizan principalmente para

	Hidrocarburos saturados (%)	Hidrocarburos aromáticos (%)	Resinas (%)	Asfaltenos (%)
Muséem National d'Histoire Naturelle	26.6	52.8	8.4	12.2
IFP (original)	23	54	12.5	10.3
IFP (émulsion)	21	54	27.7	
CSIC Barcelone	21.6	50.7	34.7	

la muestra, tal cual se recibe; es decir, el análisis elemental y la espectrofotometría de infrarrojos.

### **Análisis Elemental**

#### **Determinación del contenido en carbono e hidrógeno**

El contenido en carbono e hidrógeno se determina por combustión total de la materia orgánica y midiéndolos como  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (ver figura 1). Por lo tanto, el agua presente en la muestra puede ser interpretada como hidrógeno, por lo que es imprescindible, antes de utilizar los datos, asegurarse de que está hecha la corrección pertinente.

Con la mayoría de los equipos utilizados en el análisis elemental también se puede obtener el contenido en cenizas. Este dato no se corresponde exactamente con el determinado según normas, ya que las condiciones del ensayo son mucho más oxidantes, pero sí da una estimación del porcentaje de fracción mineral.

#### **Determinación del contenido en Oxígeno**

Aunque existen métodos específicos para la determinación del contenido en oxígeno, en realidad son mucho más laboriosos y producen mayor dispersión de resultados que el método más utilizado: el de determinación por diferencia:

$$\%O = 100 - [(\%C) + (\%H) + (\%N) + (\%S)]$$

Esta forma de cálculo deriva de suponer que la materia orgánica está compuesta únicamente por C, H, N, S y O. Pero, además, la expresión anterior supone que el 100% es materia orgánica. Esto exige que dicha expresión sólo será válida en base seca total exenta de materia mineral (STEMM).

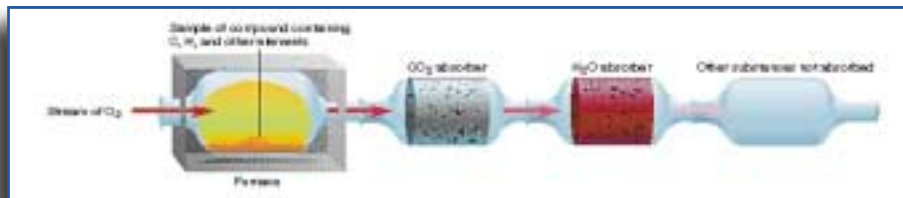


Figura 1. Determinación de C e H mediante combustión de la materia orgánica.

#### **Determinación del contenido en nitrógeno**

Su determinación es necesaria para el cálculo del contenido en oxígeno. Actualmente existen equipos que dan el contenido en nitrógeno, junto con los del análisis elemental clásico. Al oxidar la materia orgánica, no sólo miden el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{H}_2\text{O}$  producidos, también miden el  $\text{NO}_2$  y a partir de ese dato, calculan el contenido de nitrógeno en la muestra. El nitrógeno deriva de las proteínas, alcaloides y clorofila, presentes en la materia orgánica inicial.

#### **Determinación del contenido en azufre**

También es necesaria su determinación para poder calcular el oxígeno. Existen equipos, diseñados principalmente para el análisis de carbones, que permiten determinar el contenido total en azufre de una forma barata, precisa y rápida.

El procedimiento más utilizado es, también, mediante su combustión y la posterior medida del  $\text{SO}_2$  producido. El problema, o la ventaja, de esta técnica es que, dependiendo de la temperatura de análisis, puede ser que parte del azufre contenido en la muestra permanezca en ella sin llegar a ser medido. Por ejemplo, algunos sulfatos. En el caso del petróleo, al no llevar pirita incorporada, se simplifica el problema analítico.

#### **Espectrofotometría de Infrarrojos**

La determinación que se suele hacer mediante esta técnica es la de hidrocarburos de petróleo totales (TPH) por lo que normalmente se hace a partir del análisis de la muestra de

petróleo inicial (sin separar en fracciones).

Para el caso de muestras sólidas (norma ISO 11046) (suelos o arenas en las que ha habido un derrame de hidrocarburos), habría que tomar unos 15 gramos de muestra de suelo y triturarlos. Se tritura para que el tamaño de grano sea fino, aumentando así la superficie de contacto entre disolvente y muestra. Después se mezcla con sulfato sódico anhidro, que es un desecante químico que va a retener la humedad, dado que la muestra que se va a analizar por infrarrojos no ha de tener agua en su composición.

Una vez preparada la muestra, se procede a su extracción, para lo que se mezcla con 20 ml de CFE-113 y se agita con una placa agitadora, durante 30 minutos. Una vez pasado este tiempo se espera a que decante el suelo, se filtra y se recoge el disolvente. Al suelo se le añaden otros 20 ml de CFE-113 y se repite el proceso. Al extracto final se le añaden 5 gramos de silicato magnésico, que va a limpiar la muestra (es decir, retener aquellos compuestos que no se consideran como TPHs), y se agita durante otra media hora, se filtra, llevamos el volumen final del extracto a 50 ml y ya tenemos nuestra muestra lista para ser analizada en el equipo de infrarrojos.

En el caso de muestras líquidas (método EPA 413.2) (aguas donde ha habido un derrame de hidrocarburos), la extracción se suele realizar con un litro de muestra. En primer lugar, se acidifica la muestra hasta un  $\text{pH} < 2$  con HCl. Una vez hecho esto, se procede a la extracción de la muestra de agua, para lo que se coloca en un embudo de decan-

tación como el de la figura 2, se añaden 30 ml de CFE-113 y se agita durante 3 minutos. Son líquidos inmiscibles y el CFE-113 va a quedar en la parte inferior del embudo de decantación. Se recoge el CFE-113, filtrándolo sobre un filtro con sulfato sódico para evitar recoger las gotas de agua que puedan quedar en la interfaz entre los dos fluidos. Se vuelve a añadir otros 30 ml de disolvente en el embudo de agitación y se vuelve a agitar durante otros tres minutos, repitiéndose el proceso otras dos veces. El extracto final se lleva a un volumen final de 100 ml y ya está en condiciones de ser analizado por infrarrojos.

Sin embargo, lo que nosotros queremos es dar un valor cuantitativo, para lo se calibra el equipo con patrones de hexadecano, isooctano y benceno, con seis concentraciones diferentes.

En la figura 3 podemos ver un equipo de infrarrojos. Este equipo va a estudiar los enlaces de las moléculas. Por lo tanto, lo que va a hacer es estudiar las distintas longitudes de onda (abcisas) en las que absorben estos enlaces; en ordenadas se tiene la absorbancia: a mayor absorbancia en un determinado enlace, mayor cantidad de compuestos que tienen ese enlace tiene la muestra. En la figura 4 vemos los seis patrones en distintas concentraciones y se estudia las bandas de enlace donde absorben los aromáticos, los alifáticos y los cíclicos.

A partir de los resultados, se dibujan las rectas de calibración como la de la figura 5. En este caso tendríamos tres rectas de calibración, una para cada longitud de onda de estudio. La que tenemos en la figura corresponde a los aromáticos.

Aunque la figura 6 corresponde a cómo evoluciona la materia orgánica a medida que se va viendo sometida a mayor



Figura 2. Embudos de decantación para la extracción de muestras de agua.

presión y temperatura, nos puede servir para ilustrar cómo se aplicaría esta técnica al estudio de la biodegradación. Normalmente, cuando una muestra se biodegrada, lo que suele ocurrir es que disminuye el contenido en cadenas alifáticas, que son las primeras que metabolizan los microorganismos; por lo tanto, lo primero que se detectará será una disminución del pico correspondiente a las cadenas alifáticas.

#### **Análisis mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)**

Mediante las técnicas que se describirán a continuación (cromatografía de gases-espectrometría de masas) sólo

se pueden analizar aquellos compuestos cuyo peso molecular no sea muy elevado, por lo que no vamos a poder analizar ni las resinas ni los asfaltenos.

#### **Extracción de Muestras de Hidrocarburos**

Las distintas técnicas de extracción que se pueden usar dependen fundamentalmente de la matriz en la que se encuentren dichos hidrocarburos (ver esquema 2). Para nuestros propósitos, cabe diferenciar tres matrices distintas:

- Muestra sólida. Cuando se quieren estudiar los compuestos de un suelo en el que ha habido un derrame de hidrocarburos. Requiere la extracción para separar los compuestos de interés de la matriz sólida. El método de extracción que se utilizará será el de extracción con Soxhlet.
- Muestra líquida. En el caso de que se desee analizar un agua que ha estado en contacto con un derrame de hidrocarburos. Requiere la extracción para separar los compuestos de interés de la matriz líquida. El método de extracción que se utilizará será el de extracción en fase sólida (SPE).
- Muestra del crudo de petróleo. No requiere extracción, ya que la muestra está compuesta por hidrocarburos.

Figura 3. Espectrofotómetro de Infrarrojos.





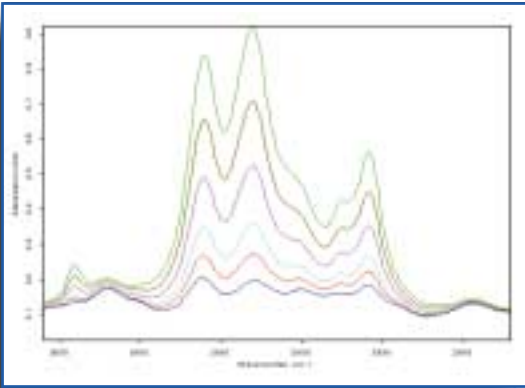


Figura 4.  
Espectros de  
infrarrojos de  
los patrones de  
calibración.

#### Extracción de Hidrocarburos en Muestras Sólidas con Soxhlet

A continuación se verá cuál es el proceso a seguir cuando una muestra sólida en la que ha habido un derrame de hidrocarburos llega al laboratorio. El primer paso consiste en la preparación de las muestras:

- Se coge entre 5 y 20 gramos de muestra, en función de la cantidad de compuestos orgánicos que suponemos tiene la muestra; es decir, si se sospecha que la muestra tiene muchos compuestos, se coge menor cantidad, y a la inversa. En el caso de que haya habido un derrame de hidrocarburos, normalmente valdrá con 5 gramos, o incluso con menor cantidad.
- Se tritura la muestra, para permitir obtener una mayor superficie de contacto entre la muestra y los disolventes que van a extraer los compuestos.
- Se mezcla con sulfato sódico anhidro, que es un desecante químico que va a retener el agua que pudiera tener la muestra; también se puede meter la muestra en la estufa durante una noche para eliminar parte de la humedad. En este último caso, la temperatura no ha de ser muy alta (máximo 50°C) ya que si no, se perderían los compuestos más volátiles.
- Se calcula el peso en seco de la muestra, tomando una cantidad de muestra similar a la que se va a extraer, metiéndola en la estufa una noche a 110°C y pesándola

antes y después de meterla en la estufa. Hay que tener en cuenta que esta muestra no se va a extraer porque, junto con el agua, ha perdido aquellos compuestos cuya temperatura de vaporización sea inferior a 110°C.

Una vez que se han preparado las muestras, se comienza con la extracción propiamente dicha, según el método de extracción de la EPA 3540 C.

- La muestra se introduce en un cartucho de extracción de fibra de cuarzo. Si se quiere realizar el análisis cuantitativo de unos compuestos determinados, se añade el patrón subrogado que sirve para medir la eficiencia de la extracción. Este patrón subrogado está formado por uno o dos compuestos, que

se eligen con propiedades similares a las de los compuestos orgánicos que se quieren cuantificar. De esta forma, se añade una determinada cantidad conocida al inicio del análisis, para determinar la cantidad de dichos compuestos que perdemos durante la extracción.

- El cartucho de extracción se introduce en un Soxhlet como el de la figura 7.
- Debajo del soxhlet se coloca un matraz de vidrio, donde va a estar inicialmente el disolvente con el que se van a extraer los compuestos orgánicos de la muestra. La mezcla de disolventes que se suele usar es: Diclorometano-Metanol (2:1).
- Debajo del matraz se coloca una manta calefactora, que va a hacer que el disolvente se evapore.

Esquema 2.  
Extracción y  
análisis mediante  
GC-MS.

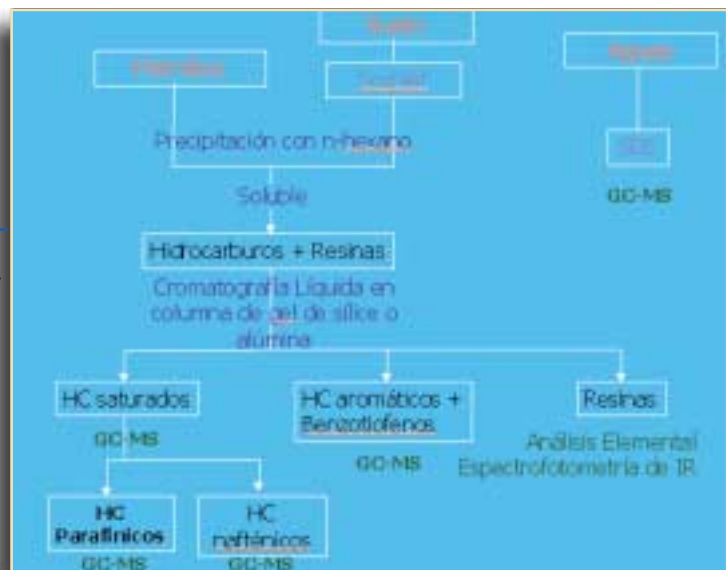
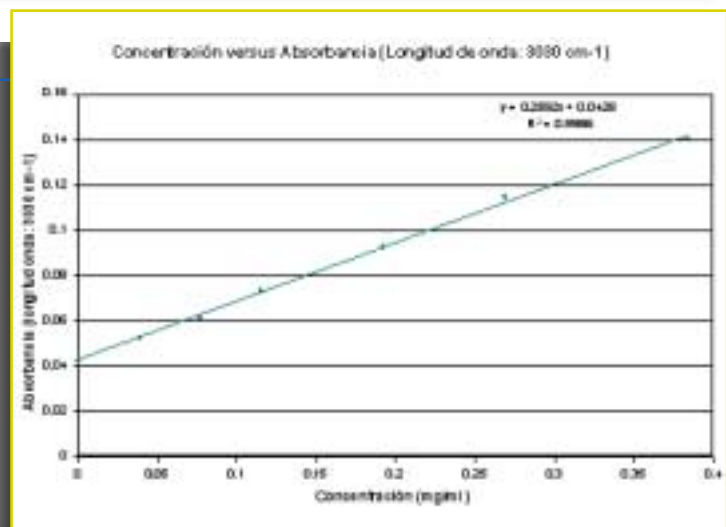


Figura 5.  
Ejemplo de  
recta de  
calibración.

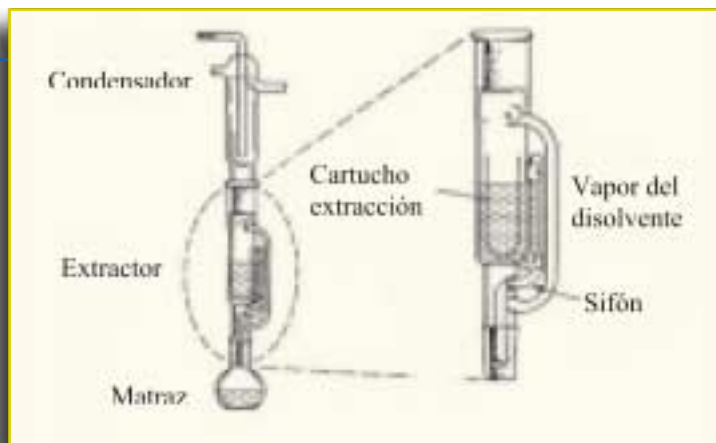


- Debajo de la manta se coloca un agitador magnético, que va a permitir que el calor se reparta por igual en el disolvente que se encuentra en el matraz.
- Encima del Soxhlet se coloca un refrigerante, que permite que el disolvente que se ha evaporado condense y vaya lavando la muestra, a medida que va llenando el Soxhlet. Cuando el nivel de líquido llega a una posición cercana a la parte superior, sifona y cae en el matraz, de tal manera que lo que se evapora es disolvente puro y lo que queda en el matraz son los compuestos extraídos de la muestra.

#### Extracción de Hidrocarburos en Muestras Líquidas

A continuación se explicará en qué consiste la extracción de los compuestos orgánicos disueltos en el agua (tras un vertido de hidrocarburos). Este método consiste en la separación de los componentes de un líquido en un medio de extracción sólido. El método que se utiliza es el de extracción en fase sólida,

Figura 7. Esquema de una extracción con Soxhlet.



da, que consta de cinco pasos (ver figura 8):

- Se elige un tubo de tipo SPE adecuado, que va a depender de los compuestos que queremos extraer y de la matriz en la que se encuentren. Estos tubos tienen una pequeña cantidad de sólido (25-500 mg), donde se van a quedar retenidos los compuestos de interés.
- Se acondiciona el tubo, pasando disolventes adecuados y agua ultrapura, para, por un lado, eliminar las impurezas que pudiera haber y, por otro, para prepararlo para que retenga los compuestos que se quieren extraer de la muestra. Al humedecer la fase sólida previamente a la extracción de la muestra, se va a mejorar la reproducibilidad del método.
- Se añade la muestra de agua que llevará el patrón subrogado, para ver la eficiencia de la extracción. Este patrón se añade a la muestra justo antes de comenzar la extracción.
- Se añade agua ultrapura, para lavar el tubo y tratar de eliminar aquellos compuestos "no retenidos" que todavía permanezcan en el interior de la fase sólida.
- Se utiliza diclorometano u otro disolvente adecuado, en función de la naturaleza de los compuestos que se quieren extraer.

#### Limpieza en columna (cromatografía líquida en columna)

Una vez extraída la muestra por cualquiera de los métodos anteriores, se van a tener los compuestos de interés disueltos en un determinado volumen de disolvente. Antes de realizar esta cromatografía líquida en columna, es necesario reducir el volumen de disolvente a dos mililitros. Esto se hace mediante un aparato denominado rotavapor, como el de la figura 9.

El matraz con el disolvente al que se hace girar, se coloca en un baño de agua caliente. Al mismo tiempo, se aplica el vacío a la muestra. Tanto el vacío como el calor, van a hacer que el disolvente se vaya evaporando. El vapor llega a una zona donde hay un refrigerante que hace que el disolvente condense y caiga en otro matraz de residuos, de tal manera que en el matraz de la muestra, el volumen del extracto disminuye hasta llegar a un volumen final de 2 ml.

Una vez que se tienen compuestos de interés concentrados en un volumen de 2 ml, se procede a realizar la limpieza (fraccionamiento) en columna pero, ¿por qué es interesante realizar esta limpieza? Tiene fundamentalmente dos objetivos:

- Evitar que pasen sustancias que puedan dañar al equi-

Figura 6. Espectros de infrarrojos que muestran cómo evoluciona la materia orgánica, a medida que se va viendo sometida a mayor presión y temperatura.

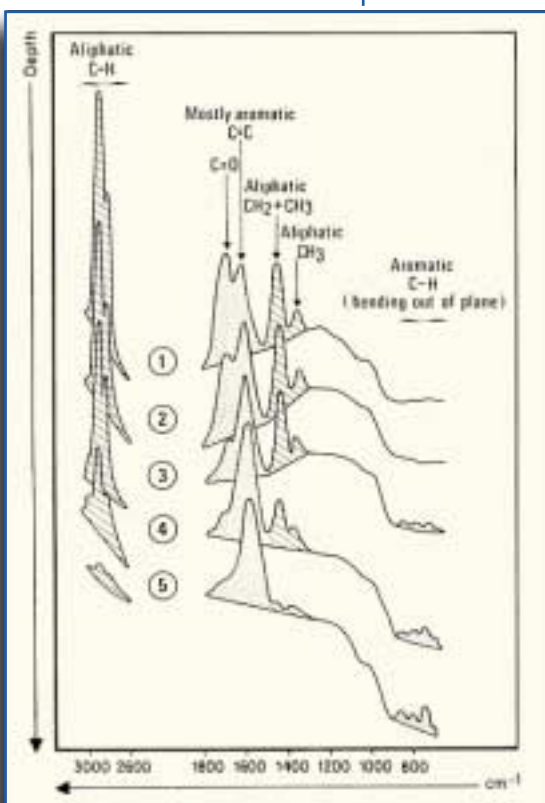




Figura 8. Extracción de compuestos orgánicos disueltos en agua.

po de análisis (sustancias de elevado peso molecular, que pueden dañar la columna), en nuestro caso un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masas.

b) Separar los compuestos que tenemos en la muestra en varias familias de distinta polaridad, de tal manera que después sea más fácil su identificación. Hay que tener en cuenta que en estas muestras procedentes de hidrocarburos existe una gran cantidad de compuestos orgánicos, lo cual va a dificultar su posterior identificación, por lo que es buena idea el ir separando los compuestos en distintas fracciones.

Este paso de limpieza en columna de la muestra va a ser previo a su análisis y conviene hacerlo siempre que se estén analizando muestras sólidas o muestras de hidrocarburos. En el caso de muestras de agua no es tan interesante, dado que va a haber una mucho menor cantidad de compuestos orgánicos a extraer. Estos compuestos suelen ser de bajo peso molecular (dado que los de alto peso molecular no se disuelven, por lo general), por lo que no van a dañar el equipo de análisis. ¿En qué consiste la limpieza en columna?

Las columnas son de vidrio (ver figura 10). En la parte inferior se coloca lana de vidrio y se rellenan, en nuestro caso, con sílice y alúmina, que va a ser la fase estacionaria.

Se moja la columna con hexano y se añade la muestra

(2 ml); después se van añadiendo, sucesivamente, las fases móviles. En nuestro caso van a ser 3, que van de menor a mayor polaridad:

- 60 ml de hexano, que va a permitir separar compuestos poco polares, tales como los hidrocarburos alifáticos.
- 70 ml de diclorometano:hexano (4:1), que va a permitir separar compuestos de polaridad intermedia, tales como los hidrocarburos aromáticos.
- 60 ml de metanol, que va a permitir separar los compuestos de mayor polaridad.

En el caso de que estemos separando una muestra de petróleo, se puede hacer una medida aproximada de la cantidad de compuestos de distinta naturaleza química que contiene. Se toma una pequeña cantidad de muestra (menos de un gramo) y se pesa. A continuación se disuelve con hexano. La parte que no se disuelve, que corresponde

a los asfaltenos, se pesa, para determinar el porcentaje de asfaltenos, comparándolo con el peso total. Después se procede a hacer la separación en columna, de tal manera que:

- Al obtener la primera fracción, se puede evaporar el disolvente y pesar el residuo (compuestos separados con hexano). De esta forma, se tendrá el porcentaje de hidrocarburos alifáticos.
- Si se evapora el disolvente de la segunda fracción y se pesa el residuo, se tendrá el porcentaje de hidrocarburos aromáticos.
- Si se evapora el disolvente de la tercera fracción y se pesa el residuo, se tendrá el porcentaje de lípidos.

Al final, se van a obtener 3 fracciones con familias de distinta polaridad, cuyo volumen se va a reducir en un rotavapor hasta 1 mililitro.

### **Cromatografía de gases - Espectrometría de masas (GC-MS) (ver figura 11)**

La cromatografía de gases es una técnica en la que una mezcla de compuestos se pasa sobre una superficie de material inmóvil (o fase estacionaria que puede ser sólida o líquida) que tiene distinta

Figura 9. Detalle de un rotavapor.



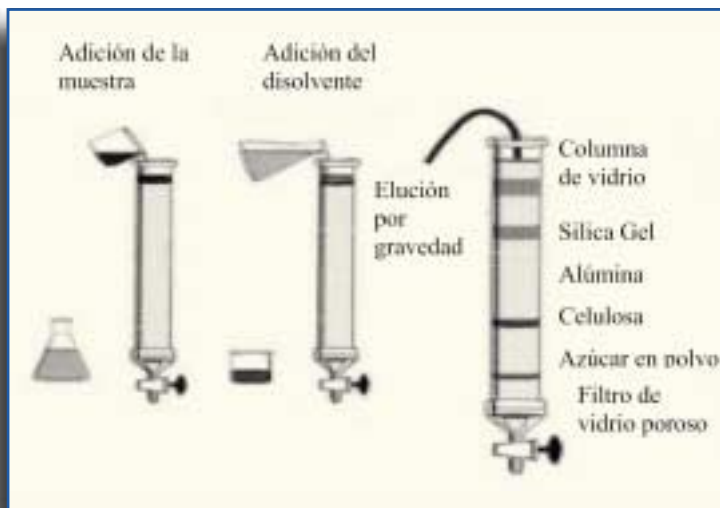


Figura 10.  
Columna de  
Cromatografía.

afinidad por los distintos tipos de compuestos de la mezcla. Esta mezcla se mueve sobre la superficie de la fase estacionaria en un fluido adecuado (un gas en el caso de la cromatografía de gases), que se denomina fase móvil, y la separación de los compuestos se produce en función del distinto grado de retención de la fase estacionaria. En la aplicación de la cromatografía de gases al análisis de hidrocarburos líquidos, la fase estacionaria es una película fina, situada en la pared interior de una columna capilar, larga y tubular. Estas columnas suelen estar hechas de sílice, con unos 25 m de longitud y un diámetro interno de 0,25 mm. La fase estacionaria suele ser una película líquida de metilsilicona de unos 0,25 mm de espesor, que puede inmovilizarse mediante enlaces químicos a la pared de vidrio de la columna. La fase móvil es un gas inerte, normalmente helio, que pasa a través de la columna bajo presión. El nombre exacto de esta técnica es cromatografía gas-líquido, dado que implica una fase móvil gaseosa (también llamada gas portador) y una fase estacionaria líquida.

Teóricamente, los compuestos presentes en la muestra emergen de la columna de forma individual y a distintos intervalos, transportados por la fa-

se móvil (proceso conocido como elución), de tal forma que no hay dos compuestos que eluyan al mismo tiempo. Los compuestos se separan como resultado de la retención producida por la fase estacionaria. Dado que un compuesto sólo se puede mover a lo largo de la columna cuando se encuentra en fase gaseosa, el tiempo que tarda en eluir (su tiempo de retención) depende de su presión de vapor (punto de ebullición) y de su afinidad química por la fase estacionaria (por ejemplo, solubilidad). Cuanto menor sea su presión de vapor (mayor punto de ebullición) y/o mayor sea su solubilidad, más tiempo tardará en eluir, debido a que la proporción de tiempo que pa-

sará en fase gaseosa será inferior. Para una serie homóloga, como los n-alcenos, la naturaleza química de los miembros individuales es similar, así que su interacción con la fase estacionaria será similar. El orden de elución está, por lo tanto, determinado por su volatilidad, la cual descende cuando aumenta el número de carbonos.

Se introduce una mezcla en extracto en una pequeña cantidad de disolvente (por ejemplo, 1 ml de hexano) en cabeza de columna. Un sistema de introducción típico es mediante una jeringa, se inyecta a través de un septum (lo que causa una mínima alteración del flujo de gas portador) en un puerto de inyección que se calienta (300°C) para que toda la muestra se vaporice rápidamente y entre en la columna en un corto período de tiempo. La cromatografía gas-líquido requiere que los componentes se encuentren en fase gaseosa, por lo que deben tener presiones de vapor suficientemente altas. Los compuestos no volátiles no pueden analizarse mediante esta técnica, dado que nunca saldrán de la columna. La elución de los compuestos menos volátiles de una mezcla se

Figura 11.  
Cromatógrafo  
de Gases -  
Espectrómetro  
de Masas.





consigue aumentando la temperatura de la columna uniformemente a lo largo del análisis. El tiempo que pasa entre que emerge la primera y la última molécula de un mismo compuesto es muy corto.

Una vez que las moléculas salen de la columna del GC, entran en la región de ionización del espectrómetro de masas. Una vez allí, son bombardeadas con electrones energéticos, que expelen al menos un electrón de cada molécula, produciendo iones moleculares cargados positivamente, que son acelerados hacia el sistema de detección. El espectrómetro de masas trabaja a una presión muy baja (cerca de un vacío perfecto), para facilitar el paso de los iones hacia el detector. Los iones moleculares tienen una gran cantidad de energía, por lo que suelen ser bastante inestables, lo que hace que se fragmenten en iones más pequeños, relativamente estables. Mediante la aplicación de campos electromagnéticos, puede modificarse la trayectoria de estos iones de tal forma que va a depender del ratio masa/carga (representado normalmente por  $m/z$ ) de un ión individual. Estos campos hacen que en cada momento sólo los iones de un valor  $m/z$  determinado lleguen al detector (normalmente un multiplicador de electrones), produciendo una corriente medible. Modificando estos campos, se puede barrer un rango de valores  $m/z$  durante un determinado periodo de tiempo (1 s). La corriente de iones, que es proporcional al número de iones producidos, se registra para cada valor de  $m/z$  durante el barrido, lo que permite construir un espectro de masas. También se puede obtener un gráfico (ver figura 12) (denominado cromatograma) de la corriente total de iones versus el tiempo.

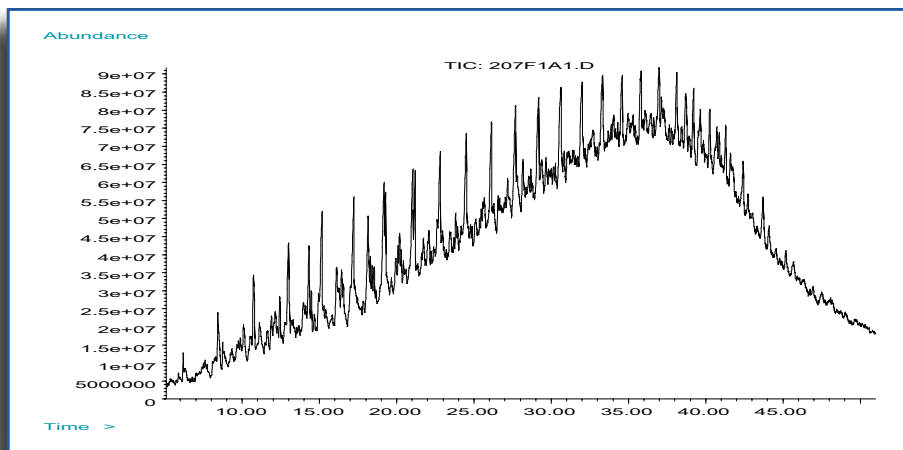


Figura 12. Cromatograma de una muestra de hidrocarburo poco degradado. Se pueden ver una serie de picos correspondientes principalmente a los n-alcenos. Estos compuestos son muy biodegradables. También se puede observar un abultamiento en la base del cromatograma, que se conoce como mezcla compleja de sustancias (UCM) que no han sido separadas por cromatografía. A medida que aumenta la biodegradación, va a ir aumentando la UCM y disminuyendo la altura de los picos de alcanos.

### Evaluación de la distribución de los distintos compuestos

Como se puede observar en la figura 12, es imposible identificar aquellos compuestos que no han podido ser separados del resto y forman el abultamiento (UCM) en la base del cromatograma.

Sin embargo, dado que los iones de fragmentación producidos a partir de un ión molecular son característicos de la estructura de un compuesto, ayudan en la identificación estructural de un compuesto previamente desconocido. Algunos iones de fragmentación son particularmente

abundantes y pueden pertenecer a compuestos relacionados que tienen unidades estructurales en común. Por ejemplo, en el caso de los n-alcenos, un ión de fragmentación característico de dicha familia es el de  $m/z=57$ . A partir del cromatograma inicial, se pueden seleccionar sólo aquellos compuestos que tienen el ión 57 y obtendríamos el cromatograma de la figura 13.

La selección de un ión de fragmentación característico se realiza para la identificación de todas las familias de compuestos que contiene nuestro extracto (figuras 14 y

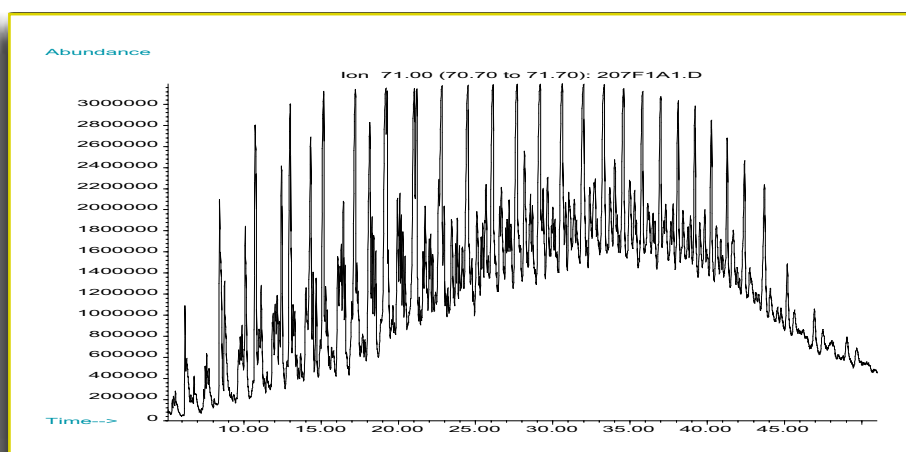


Figura 13. Cromatograma con sólo aquellos compuestos que contienen el ión 57. Podemos observar en este caso que la UCM ha disminuido debido a que ya no aparecen aquellos compuestos que no tengan el ión 57. Quizá en este caso no facilita demasiado la identificación de los n-alcenos porque eran fácilmente identificables, pero en otras ocasiones es muy útil esta opción.

15): alcanos metil sustituidos, insaturados, cicloalcanos, aromáticos...

Como podemos observar, en una sola muestra existe una gran cantidad de compuestos

y, por lo tanto, una gran cantidad de información. Normalmente, al estudiar una muestra nos solemos centrar en una o varias familias de compuestos que nos permiten obtener la información

que andamos buscando. Es prácticamente imposible estudiar todas las familias de compuestos, no sólo cuantitativamente (dada su cantidad) sino tampoco cualitativamente, dado que hay compuestos para los cuales no existen ni patrones comerciales. Sin embargo, es importante tener en cuenta que existen muchísimas más familias de compuestos que no se estudian, y que también pueden proporcionar información.

El cromatograma de corriente total de iones frente al tiempo, para cada muestra, se almacena después del análisis, para que en cualquier momento tengamos toda esta información a nuestro alcance. Para hacernos una idea de la cantidad de compuestos (y, por lo tanto, la cantidad de información) que hay en un solo cromatograma, baste decir que la información contenida en un cromatograma puede llegar a ocupar unos 12 Megabytes.

### Bibliografía

- Bordenave, L.** 1993. Applied Petroleum Geochemistry. París, 1993.
- Killops, Stephen, D. y Killops, Vanessa J.** 1993. An introduction to Organic Geochemistry. Longman Group. U. K. Ltd.
- Llamas, J. F.; García, E. y Canoira, L.** Quimiometría y Métodos de Análisis Instrumental. (Notas de clase).
- Tissot, B. P. y Welte, D. H.** 1978. Petroleum Formation and Occurrence. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany.
- Métodos de análisis de la **Agencia Medioambiental Estadounidense** (U.S.-E.P.A.) ([www.epa.gov](http://www.epa.gov)).
- Norma ISO TR 11046: "Soil Quality – Determination of mineral oil content – Method by infrared spectrometry and gas chromatographic method.

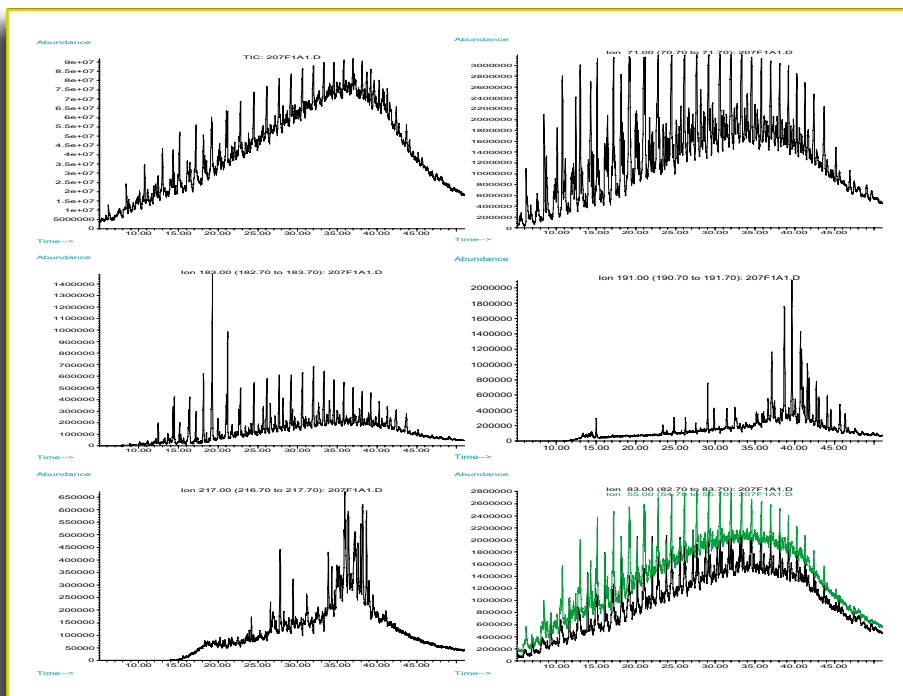


Figura 14. Cromatograma de la primera fracción (A) (hidrocarburos saturados) de la muestra de chapapote y de distintas familias presentes en dicha fracción mediante la selección de iones de fragmentación característicos: (B) alcanos (ión 71), (C) isoprenoides (ión 183), (D) hopanos (ión 191), (E) esteranos (ión 217) y (F) cicloalcanos (iones 83 y 55).

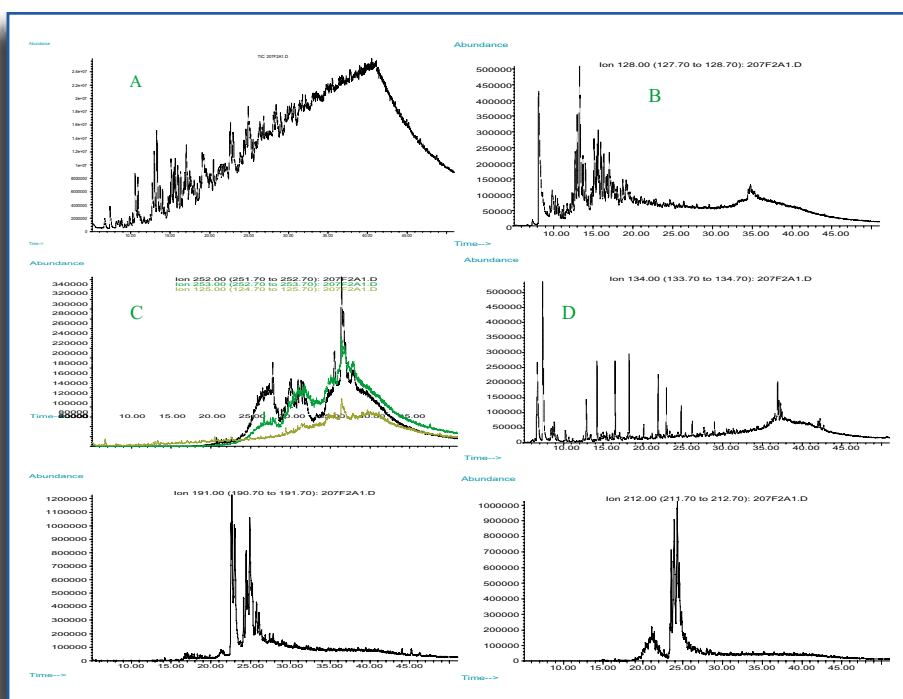


Figura 15. Cromatograma de la segunda fracción (A) (hidrocarburos aromáticos y benzofluorantenos) de la muestra de chapapote y de distintas familias presentes en dicha fracción mediante la selección de iones de fragmentación característicos: (B) naftaleno (ión 128) y dimetilnaftalenos (ión 156, 141 y 128), (C) benzo(a)pireno (iones 252, 253 y 125), (D) metilbencenos (ión 134), (E) metilfenantrenos y metilantracenos (ión 191) y (F) benzofluorantenos (ión 212).