

Determinación de hidrocarburos policíclicos en aire. Método de captación en filtro y tubo adsorbente y detección fluorimétrica / Cromatografía líquida de alta resolución

MTA/MA-039/A00

Palabras clave: hidrocarburos aromáticos policíclicos, cromatografía líquida.

PRESENTACIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) constituyen un grupo de compuestos que han recibido una especial atención a causa de que muchos de ellos son carcinogénicos o mutagénicos. Dentro del campo laboral, la exposición potencial a estos compuestos puede tener lugar en diferentes tipos de industrias como fundiciones de hierro y acero, la industria del aluminio, la industria de la goma y el caucho, plantas de coque, refinerías de petróleo, en la fabricación y uso de alquitrán, asfaltos y derivados, en trabajos de limpieza de chimeneas, etc.

El método "*Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aire. Método de captación en filtro y tubo adsorbente y detección fluorimétrica / Cromatografía líquida de alta resolución*" es un **MÉTODO ACEPTADO** por el [Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo \(INSHT\)](#). Como **MÉTODO ACEPTADO** se entiende un método utilizado en el INSHT y que ha sido sometido a un protocolo de validación por organizaciones oficiales competentes en el área de la normalización de métodos analíticos, o bien ha sido adoptado como método recomendado por asociaciones profesionales dedicadas al estudio y evaluación de riesgos por agentes químicos, así como aquellos métodos recomendados por la UE o basados en métodos ampliamente conocidos y evaluados por especialistas en este tipo de análisis.

Índice

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

3. REACTIVOS

3.1 Agua ultrapura

3.2 Acetonitrilo

3.3 Diclorometano

3.4 Sulfato sódico

3.5 Sulfuro de carbono

3.6 2-propanol (isopropanol)

3.7 Metanol

3.8 Helio

3.9 Disolución estándar de referencia NIST 1647d en acetonitrilo

3.10. 1-Metilnaftaleno

3.11. 2-Metilnaftaleno

3.12. Benzo(e)Pireno

3.13. 1-Fluoronaftaleno

3.14. 2,2'- Binaftilo

3.15. Disolución de 6 mg ml⁻¹ de 1-Metilnaftaleno

3.16. Disolución de 3 mg ml⁻¹ de 2-Metilnaftaleno

3.17. Disolución de 1,3 mg ml⁻¹ de Benzo(e)Pireno

3.18. Disolución de 60 µg ml⁻¹ 1-Metilnaftaleno, 48 µg ml⁻¹ 2-Metilnaftaleno y 52 µg ml⁻¹ Benzo(e)Pireno

3.19. Disolución de 20 µg ml⁻¹ de 1-Fluoronaftaleno

3.20. Disolución de 500 µg ml⁻¹ de 2,2'-Binaftilo

3.21. Disolución de 50 µg ml⁻¹ de 2,2'-Binaftilo

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1 Aparatos y material de toma de muestra

4.2 Aparatos y material para el análisis

5. TOMA DEMUESTRA

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1 Preparación de muestras y blancos

6.2 Preparación de patrones y curva de calibrado

6.3 Condiciones cromatográficas

7. CÁLCULOS

7.1 Determinación de la concentración de analito presente en el tubo de adsorción

7.2 Determinación de la concentración de analito presente en el filtro

7.3. Determinación de la concentración de analito presente en filtro + tubo de adsorción

7.4. Determinación de la concentración del analito en aire cuando filtro y tubo se tratan de forma separada

7.5. Determinación de la concentración del analito en aire cuando filtro y tubo se tratan de forma conjunta

8. PRECISIÓN

9. BIBLIOGRAFÍA

Anexo A. Tablas

Anexo B. Cálculo del volumen corregido V_{CORR}

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

Este método especifica el procedimiento a seguir y el equipo necesario para la determinación simultánea de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en aire mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorimétrica (HPLC-F). Los hidrocarburos determinados seguidos de su n° CAS (Chemical Abstract Service) son los siguientes:

Naftaleno	(91-20-3)	Benzo (a) antraceno	(B (a) A)	(56-55-3)
1-Metilnaftaleno	(90-12-0)	Criseno		(218-01-9)
2-Metilnaftaleno	(91-57-6)	Benzo(e)pireno	(B (e) P)	(192-97-2)
Acenafteno	(83-32-9)	Benzo (b) fluoranteno	(B (b) F)	(205-99-2)
Fluoreno	(86-76-7)	Benzo (k) fluoranteno	(B (k) F)	(207-08-9)
Fenantreno	(85-01-8)	Benzo (a) pireno	(B (a) P)	(50-32-8)
Antraceno	(120-12-7)	Dibenzo(a,h)antraceno	(D (a, h) A)	(53-70-3)

Fluoranteno	(206-44-0)	Benzo(g,h,i)perileno	(B (g, h, i) P)	(191-24-2)
Pireno	(129-00-0)	Indeno(1,2,3-c,d)pireno	(I(1,2,3-c,d)P)	(193-39-5)

Se considera como interferencia cualquier otro compuesto orgánico, que presente el mismo o próximo tiempo de retención que los compuestos a analizar, en las condiciones de operación descritas en este método. Estas interferencias pueden minimizarse seleccionando las condiciones y columnas cromatográficas adecuadas.

2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

Los HAPs presentes en el aire tanto en forma vapor como aerosol, se recogen en filtros y tubos adsorbentes utilizando una bomba de muestreo personal. Los filtros y tubos adsorbentes se someten a un proceso de extracción para la preparación de las muestras. Los diferentes HAPs extraídos se determinan mediante cromatografía líquida de fase reversa con detección fluorimétrica con un programa adecuado de longitudes de onda de excitación y emisión para cada compuesto o grupo de compuestos y un programa de gradiente de concentración del eluyente.

3. REACTIVOS

3.1 Agua ultrapura, calidad 1 de acuerdo con la NORMA ISO 3696 (9.14.) y desgasificada.

3.2 Acetonitrilo para cromatografía líquida, grado gradiente desgasificado.

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA TÓXICA E INFLAMABLE, Frases (R): 11-23/25. Frases (S): 2-7-16-24. [Real Decreto 363/1995 \(9.13.\)^{\(1\)}](#).

3.3 Diclorometano, para cromatografía líquida

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA NOCIVA. Frases (R): 40. Frases (S): (2)-23-24/25-36/37. [Real Decreto 363/1995 \(9.13.\)^{\(1\)}](#).

3.4 Sulfato sódico, p.a.

3.5 Sulfuro de carbono, para espectroscopía IR.

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA TÓXICA Y FÁCILMENTE INFLAMABLE. Frases (R): 11-36/38-48/20-48/23-62-63. Frases (S): 16-33-36/37-45. [Real Decreto 363/1995 \(9.13.\)^{\(1\)}](#).

3.6 2-propanol (isopropanol), grado gradiente.

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA FÁCILMENTE INFLAMABLE. Frases (R): 11. Frases (S): 2-7-16. [Real Decreto 363/1995 \(9.13.\)^{\(1\)}](#).

3.7 Metanol, para HPLC

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA TÓXICA Y FÁCILMENTE INFLAMABLE. Frases (R): 11-23/25. Frases (S): (1-2)-7-16-24-45. [Real Decreto 363/1995 \(9.13.\)^{\(1\)}](#).

3.8 Helio, calidad N-50.

3.9 Disolución estándar de referencia NIST 1647d en acetonitrilo, que contiene Naftaleno, Acenafteno, Acenaftileno, Fluoreno, Fenantreno, Antraceno, Fluoranteno, Pireno, Benzo(a)antraceno, Criseno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(k)fluoranteno Benzo(a)pireno, Dibenzo(a,h)antraceno, Benzo(g,h,i)perileno e Indeno (1,2,3-c,d)pireno.

PRECAUCIÓN: PREPARADO CANCERÍGENO. Frases (R): 45, 46, 60, 61. Frases (S): 53, 45, 36, 37, 39, 22. [Real Decreto 363/1995 \(9.13.\)^{\(1\)}](#).

3.10. 1-Metilnaftaleno, p.a.

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA TÓXICA E INFLAMABLE. Frases (R): 22-36/37/38. Frases (S): 26-36/37/39. [Real Decreto 363/1995 \(9.13.\)^{\(1\)}](#).

3.11. 2-Metilnaftaleno, p.a.

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA TÓXICA E INFLAMABLE. Frases (R): 22-36/37/38. Frases (S): 26-37/39. [Real Decreto 363/1995 \(9.13.\)^{\(1\)}](#).

3.12. Benzo(e)Pireno, p.a.

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA TÓXICA. Frases (R): 6120121122. Frases (S): 45-36/37/39-3/7. [Real Decreto 363/1995 \(9.13.\)^{\(1\)}](#).

3.13. 1-Fluoronaftaleno en disolución, 2 mg ml⁻¹ de cloruro de metileno.

PRECAUCIÓN: IRRITANTE. Frases (R): 36, 37, 38. Frases (S): 26-36. [Real Decreto 363/1995 \(9.13.\)^{\(1\)}](#).

3.14. 2,2'-Binaftilo, p.a.

PRECAUCIÓN: SUSTANCIA TÓXICA. Frases (R): 20, 21, 22, 40. Frases (S): 36, 37, 39-45. [Real Decreto 363/1995 \(9.13.\)^{\(1\)}](#).

3.15. Disolución de 6 mg ml⁻¹ de 1-Metilnaftaleno. Se pesan 0,06 g de 1-Metilnaftaleno y se disuelven en 10 ml de acetonitrilo.

3.16. Disolución de 3 mg ml⁻¹ de 2-Metilnaftaleno. Se pesan 0,03 g de 2-Metilnaftaleno y se disuelven en 10 ml de acetonitrilo.

3.17. Disolución de 1,3 mg ml⁻¹ de Benzo(e)Pireno. Se disuelven 0,013 g de Benzo(e)Pireno y se disuelven en 10 ml de acetonitrilo.

3.18. Disolución de 60 µg ml⁻¹ 1-Metilnaftaleno, 48 µg ml⁻¹ 2-Metilnaftaleno y 52 µg ml⁻¹ Benzo(e)Pireno. Se disuelven 1 ml de Benzo (e) Pireno (3.17.), 0,2 ml de 1-Metilnaftaleno (3.15.) y 0,4 ml de 2-Metilnaftaleno (3.16.) en 25 ml de acetonitrilo.

3.19. Disolución de 20 µg ml⁻¹ de 1-Fluoronaftaleno. Se disuelve 50 µl de la disolución (3.13.) de 2 mg ml⁻¹ en 5 ml de acetonitrilo

3.20. Disolución de 500 µg ml⁻¹ de 2,2'-Binaftilo. Se pesan 5 mg de 2,2'-Binaftilo y se disuelven en 10 ml con acetonitrilo.

3.21. Disolución de 50 µg ml⁻¹ de 2,2'-Binaftilo. Se diluye 1 ml de la disolución descrita en 3.20., en 10 ml de acetonitrilo

4. APARATOS Y MATERIAL

4.1 Aparatos y material de toma de muestra

4.1.1. Bomba de muestreo personal.

4.1.2. Filtros Zefluor de 37 mm de diámetro, 2 µm de tamaño de poro, Gelman o similar.

4.1.3. Tubos adsorbentes de 20 µm tamaño de partícula, Orbo-43 (polímero poroso), Supelco o similar.

4.1.4. Tubería de PVC para unir el filtro Zefluor con el tubo adsorbente.

4.2 Aparatos y material para el análisis

4.2.1. Tapones con septum para los viales

4.2.2. Viales de 1,5 ml de capacidad de color ámbar.

4.2.3. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro adaptables a jeringas para la filtración de muestras orgánicas.

4.2.4. Material de vidrio de borosilicato de acuerdo con la norma ISO 3585 (9.16.).

4.2.5. Micropipetas automáticas de 1 a 1000 µl

4.2.6. Jeringas desechables de 1 y 10 ml.

4.2.7. Película de aluminio

4.2.8. Tubos de vidrio ámbar de 13 mm x 100 mm con tapón protegido con teflón

4.2.9. Columnas para extracción en fase sólida RP-18 (500 mg) o bien C18-PAH (2000 mg).

4.2.10. Baño de ultrasonidos

4.2.11. Rotavapor

4.2.12. Balanza capaz de pesar 0,001 mg.

4.2.13. Columna cromatográfica específica para HAPs, Supelcosil →, LC-PAH 15 cm de longitud x 4,6 mm de diámetro interno (5 µm de tamaño de partícula) o similar.

4.2.14. Equipo de cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-F).

5. TOMA DE MUESTRA

5.1 Calibrar una bomba de muestreo personal conectada a un tubo adsorbente (4.1.3.) unido a un filtro Zefluor (4.1.2.) mediante un tubo corto de PVC (aproximadamente 5 cm) y colocados según el siguiente orden: filtro - tubo - bomba, en condiciones representativas de la toma de muestra utilizando un medidor de caudal externo (medidor de burbuja de jabón u otro).

5.2 Conectar la bomba al tubo de adsorción y al filtro en el mismo orden que para la calibración justo antes de empezar el muestreo. Colocar verticalmente el tubo adsorbente y filtro en la zona de respiración del trabajador (por ejemplo, sujeto a la solapa) y la bomba de muestreo sujeta en el cinturón o bolsillo. En el caso de muestras estáticas debe elegirse un lugar de muestreo adecuado.

NOTA: Si el muestreo se realiza a la luz del día, cubrir tubo adsorbente y filtro con película de aluminio para evitar la degradación de los HAP.

5.3 Realizar la toma de muestra a un caudal de 2 l min⁻¹, recogiendo un volumen total de aire entre 200 l y 1000 l.

5.4 Inmediatamente después del muestreo, introducir el filtro utilizando unas pinzas adecuadas en la parte superior de un tubo ámbar. Cerrar el tubo y cubrirlo con película de aluminio.

NOTA: Este paso es necesario para evitar pérdidas de muestra por sublimación.

5.5 Cerrar el tubo adsorbente y cubrirlo con película de aluminio.

5.6 Enviar tubos y filtros al laboratorio en un sistema aislado y refrigerado.

5.7 Con cada lote de muestra debe prepararse por lo menos un blanco, utilizando tubos y filtros idénticos a los usados para el muestreo y sometidos a las mismas manipulaciones, excepto que no se ha pasado aire a su través

6. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

6.1 Preparación de muestras y blancos

6.1.1. Procedimiento de extracción

6.1.1.1. Los filtros transportados en un tubo de vidrio ámbar se extraen mediante un sistema de ultrasonidos durante 15 min con 5 ml de sulfuro de carbono a una temperatura próxima a 20°C. Justo antes de proceder a la extracción se añaden al tubo de vidrio ámbar los estándares internos: 200 µl de la disolución descrita en el apartado 3.19. y 50 µl de la disolución descrita en el apartado 3.21.

6.1.1.2. La disolución obtenida se pasa a través de un filtro de membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,45 µm de poro, lavando tres veces con 1 ml de sulfuro de carbono cada vez.

6.1.1.3. El disolvente se elimina en el rotavapor hasta sequedad, con el baño a una temperatura próxima a 30°C y el colector enfriado a una temperatura próxima a 10°C.

6.1.1.4. El residuo se redisuelve con 0,5 ml de acetonitrilo.

Idéntico procedimiento se aplica para los tubos adsorbentes.

NOTA: En los casos en que sea más importante conocer la concentración total de HAPs por muestra que por cada medio individual, el tubo adsorbente y el filtro se pueden tratar conjuntamente dentro del mismo tubo de vidrio ámbar y aplicar un único procedimiento de extracción, a costa de no separar los HAPs recogidos en tubo (HAP ligeros) y en filtro (HAPs pesados).

6.1.2. Procedimiento de extracción (con limpieza)

NOTA: El procedimiento de extracción con limpieza previa se realizará para muestras sospechosas de contener impurezas tales que el procedimiento de extracción descrito en el apartado 6.1.1. no sea suficiente para una preparación adecuada de la muestra.

6.1.2.1. Se siguen los pasos recogidos en los apartados 6.1.1. excepto 6.1.1.4. El residuo se redisuelve en 30 ml de isopropanol, ajustando finalmente a un volumen de 250 ml con agua.

6.1.2.2. El proceso de limpieza se lleva a cabo mediante una columna de extracción en fase sólida RP-18, o bien la específica C18-PAH. La columna se activa pasando 8 ml de metanol y se acondiciona añadiendo 8 ml de agua/isopropanol (85:15 v/v).

6.1.2.3. Los 250 ml de disolución se pasan a través de la columna, se lava dos veces con 0,75 ml de agua/isopropanol (85:15 v/v) cada vez, eluyendo a continuación con 0,5 ml de diclorometano.

6.1.2.4. El extracto se seca añadiendo de 5 a 10 perlas de tamiz molecular de 0,3 nm de tamaño de poro, agitando. Al cabo de 5 min, cuando la disolución está transparente, se decanta lavando con otros dos volúmenes de diclorometano.

6.1.2.5. Se elimina el diclorometano en el rotavapor a una temperatura próxima a 40°C recogiéndolo en un colector enfriado a una temperatura próxima a 10°C.

6.1.2.6. El residuo se reconstituye con 0,5 ml de acetonitrilo y se pasa a través de un filtro de 0,45 µm de tamaño de poro, específico para disoluciones orgánicas.

6.2 Preparación de patrones y curva de calibrado

NOTA: Para la preparación de disoluciones cuyo volumen final sea inferior a 1 ml es recomendable el control gravimétrico de las mismas.

6.2.1. **Disoluciones de trabajo.** Se preparan las disoluciones tal y como se indican en los apartados 3.15., 3.16., 3.17., 3.18., 3.19., 3.20. y 3.21.

6.2.2. **Patrones de calibración.** A partir de las disoluciones descritas en los apartados 3.18., 3.19. y 3.21. y el material estándar de referencia NIST 1647d (3.9.), se preparan siete niveles de concentración de los 18 HAPs mediante diluciones apropiadas en acetonitrilo (3.2.) tal y como se especifica a continuación:

Nivel 1: 10 µl de la disolución 3.9., 5 µl de la disolución 3.18., 200 µl de la disolución 3.19. y 50 µl de la disolución 3.21., enrasando a 10 ml con acetonitrilo.

Nivel 2: 20 µl de la disolución 3.9., 10 µl de la disolución 3.18., 200 µl de la disolución 3.19. y 50 µl de la disolución 3.21., enrasando a 10 ml con acetonitrilo.

- Nivel 3:** 100 µl de la disolución 3.9., 20 µl de la disolución 3.18., 200 µl de la disolución 3.19. y 50 µl de la disolución 3.21., enrasando a 10 ml con acetonitrilo.
- Nivel 4:** 500 µl de la disolución 3.9., 50 µl de la disolución 3.18., 200 µl de la disolución 3.19. y 50 µl de la disolución 3.21., enrasando a 10 ml con acetonitrilo.
- Nivel 5:** 1000 µl de la disolución 3.9., 75 µl de la disolución 3.18., 200 µl de la disolución 3.19. y 50 µl de la disolución 3.21., enrasando a 10 ml con acetonitrilo.
- Nivel 6:** 2000 µl de la disolución 3.9., 100 µl de la disolución 3.18., 200 µl de la disolución 3.19. y 50 µl de la disolución 3.21., enrasando a 10 ml con acetonitrilo.
- Nivel 7:** 3000 µl de la disolución 3.9., 150 µl de la disolución 3.18., 200 µl de la disolución 3.19. y 50 µl de la disolución 3.21., enrasando a 10 ml con acetonitrilo.

La linealidad de los HAP determinados alcanza 0,75 µg ml⁻¹ de acetonitrilo excepto para el Naftaleno, Antraceno, Pireno y Criseno que llega a 1,0 µg ml⁻¹ de acetonitrilo.

6.2.3. Curva de calibración. La curva de calibración para cada analito se traza representando la relación de la altura del pico del compuesto respecto a la altura proporcionada por una concentración conocida de estándar interno, frente a sus respectivas concentraciones (en µg ml⁻¹ acetonitrilo). Para los compuestos más volátiles (Naftaleno, 1-Metilnaftaleno, 2-Metilnaftaleno, Acenafteno y Fluoreno) se emplea el 1-Fluoronaftaleno como estándar interno, mientras que para el resto se utiliza el 2,2'-Binaftilo.

6.2.4. La determinación de los patrones, así como la de muestras y blancos se efectúa por triplicado.

6.3 Condiciones cromatográficas

Inyección: si la inyección es automática, el volumen de inyección es de 20 µl. Si la inyección es manual, se lleva a cabo inyectando en la columna 20 µl, tras tres sucesivos llenados del bucle con el mismo volumen (volumen total 60µl).

Columna: Supelcosil LC-PAH 15 cm x 4,6 mm (5 µm) o similar. Caudal: 1,4 ml min⁻¹.

Temperatura: 27°C.

Eluyente: Acetonitrilo y agua.

Programa de gradiente: Eluyente/tiempo.

Tiempo (min)	Acetonitrilo (%)
0,0	45
5,0	45
14,5	55
15,0	60
24,0	65
25,0	75

Programa de (longitudes de onda de excitación y de emisión)/tiempo

COMPUESTO	λ _{ex} (nm)	λ _{em} (nm)	tiempo (min)
Naftaleno, 1 Metilnaftaleno, 2 Metilnaftaleno Acenafteno, Fluoreno	280	330	0,00
Fenantreno	250	365	12,60
Antraceno	240	450	16,50
Fluoranteno, Pireno	240	410	17,85
B(a)A, Criseno	265	400	21,00
B(e)P, B(b)F, B(k)F, B(a)P, B(a,h)A, B(g,h,i)P	290	410	25,50
I(1,2,3-c,d)P	250	485	35,20

7. CÁLCULOS

7.1 Determinación de la concentración de analito presente en el tubo de adsorción

La concentración de cada HAP presente en el tubo de adsorción se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$m_{\text{HAP},t} = (C_{\text{HAP},t} - C_{\text{B},t}) \times V_{\text{D},t}$$

donde:

$m_{\text{HAP},t}$ cantidad de cada HAP en μg en el tubo de adsorción.

$C_{\text{HAP},t}$ concentración de cada HAP en $\mu\text{g/ml}$ acetonitrilo en la disolución final de la muestra, obtenida en la curva de calibrado.

$C_{\text{B},t}$ concentración de cada HAP en $\mu\text{g/ml}$ acetonitrilo en el blanco, obtenida en la curva de calibrado.

$V_{\text{D},t}$ volumen de dilución del residuo de evaporación.

7.2 Determinación de la concentración de analito presente en el filtro

La concentración de cada HAP presente en el filtro se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$m_{\text{HAP},f} = (C_{\text{HAP},f} - C_{\text{B},f}) \times V_{\text{D},f}$$

donde:

$m_{\text{HAP},f}$ cantidad de cada HAP en μg en el filtro.

$C_{\text{HAP},f}$ concentración de cada HAP en $\mu\text{g/ml}$ acetonitrilo en la disolución final, obtenida en la curva de calibrado.

$C_{\text{B},f}$ concentración de cada HAP en $\mu\text{g/ml}$ acetonitrilo en el blanco, obtenida en la curva de calibrado.

$V_{\text{D},f}$ volumen de dilución del residuo de evaporación, en ml

7.3. Determinación de la concentración de analito presente en filtro + tubo de adsorción

Quando se sigue la indicación de la nota del [apartado 6.1.1.](#), es decir, cuando el tubo adsorbente y el filtro utilizados en el muestreo se combinan dentro del mismo tubo de vidrio ámbar para hacer el tratamiento de la muestra conjuntamente, la concentración de cada HAP presente en filtro + tubo de adsorción se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$m_{\text{HAP}} = (C_{\text{HAP}} - C_{\text{B}}) \times V_{\text{D}}$$

siendo:

m_{HAP} cantidad de cada HAP en μg en filtro + tubo de adsorción

C_{HAP} concentración de cada HAP en $\mu\text{g/ml}$ acetonitrilo en la disolución final, obtenida en la curva de calibrado

C_{B} concentración de cada HAP en $\mu\text{g/ml}$ acetonitrilo en el blanco, obtenida en la curva de calibrado

V_{D} volumen de dilución del residuo de evaporación, en ml.

7.4. Determinación de la concentración del analito en aire cuando filtro y tubo se tratan de forma separada

La concentración de cada HAP en el aire muestreado, en miligramos por metro cúbico, se calcula por medio de la siguiente expresión:

$$C_{\text{aire}} = \frac{(m_{\text{HAP},t} + m_{\text{HAP},f})}{V} \times 10^{-3}$$

siendo:

C_{aire} concentración de cada HAP en el aire muestreado en mg/m^3 .

$m_{\text{HAP},t}$ cantidad de cada HAP presente en el tubo de adsorción en μg .

$m_{\text{HAP},f}$ cantidad de cada HAP presente en el filtro en μg .

V volumen de aire muestreado en m³.



7.5. Determinación de la concentración del analito en aire cuando filtro y tubo se tratan de forma conjunta

Cuando se sigue la indicación de la nota del apartado 6.1.1., es decir, cuando el tubo adsorbente y el filtro utilizados en el muestreo se combinan dentro del mismo tubo de vidrio ámbar para hacer el tratamiento de la muestra conjuntamente, la concentración de cada HAP en el aire muestreado, en miligramos por metro cúbico, se calcula por medio de la siguiente expresión:

$$C_{\text{aire}} = \frac{(m_{\text{HAP}})}{V} \times 10^{-3}$$

siendo:

C_{aire} concentración de cada HAP en el aire muestreado en mg/m³.

m_{HAP} cantidad de cada HAP presente en (filtro + tubo de adsorción) en µg.

V volumen de aire muestreado en m³.

Cuando las condiciones de presión y temperatura durante el muestreo varíen significativamente respecto a las de calibración, el volumen de aire muestreado se corregirá de acuerdo con lo indicado en el [anexo B](#).

La concentración de analito en aire, expresada en ppm, se calcula por medio de la siguiente expresión:

$$C_{\text{ppm}} = C_{\text{aire}} \times \frac{24,0}{M} \times \frac{101,30}{P} \times \frac{t + 273,15}{293,15}$$

siendo:

P presión del aire muestreado en kPa (10³ N/m²)

t temperatura del aire muestreado en °C

M peso molecular del analito en g



8. PRECISIÓN

8.1. La precisión, estimada para cada compuesto en términos de coeficiente de variación (C.V.), es inferior a 8,5 %, para dos niveles de concentraciones (0,05 µg ml⁻¹ acetonitrilo y 0,2 µg ml⁻¹ acetonitrilo) . Véase [ANEXO A, tabla 2](#).



8.2. Los porcentajes de recuperación en el análisis realizado de forma inmediata tras la toma de muestra, calculados para tres niveles de concentración resultan superiores en general a 85% para los niveles bajo y medio; para el nivel más alto de concentración, se observan recuperaciones superiores a 75%. Véase [ANEXO A, tabla 3](#).

Los porcentajes de recuperación tras siete días de almacenamiento a 4°C y a -25°C calculados para tres niveles de concentración, han resultado superiores a 86% para los tubos de adsorción mantenidos a -25°C excepto para el naftaleno; para los filtros de captación la recuperación en las mismas condiciones ha sido superior a 89% para los HAPs más pesados que B(a)A (9.18.). Véase [ANEXO A, tabla 4](#).

Tras catorce días de almacenamiento mantenidos a 4°C y a -25°C, calculados para un nivel de concentración media han resultado similares y superiores al 80% para los tubos adsorbentes; para los filtros se producen pérdidas acusadas de concentración a los catorce días para los HAPs más ligeros que el Fluoranteno; para los HAPs más pesados que B(a)A las recuperaciones en filtro son similares y superiores al 80%. La influencia de la temperatura se observa en los HAPs más ligeros que B(a)A y recogidos en filtro en que la recuperación es mejor a -25°C; para el resto la recuperación es similar a las dos temperaturas. Véase [ANEXO A, tabla 4](#).



8.3. Los límites de detección de cada compuesto calculados a partir de las respectivas curvas de calibración (9.17., Miller y Miller) y expresados en µg ml⁻¹ en la disolución final en acetonitrilo, se encuentran recogidos en la [tabla 1 del ANEXO A](#).



9. BIBLIOGRAFÍA

- 9.1. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). **Manual of Analytical Methods, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons**, Method: 5506, 3rd Edition, Cincinnati, Ohio, U.S.A. 1985.
- 9.2. P.J. Boogard, N.J. Van Sitter. **Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in petrochemical industries by measurement of urinary 1-hydroxypyrene**. Occupational and Environmental Medicine, 50: 250-258 (1994).
- 9.3. Balya, R.S. Danchick. **Chromatographic techniques for characterization of coal tar pitch volatiles**. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 45(4): 260-268 (1984).
- 9.4. C. García, J.L. Pérez, B. Moreno. **Cloud point preconcentration and high-performance liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons with fluorescence detection**. Anal. Chem., 66:874-881 (1994).
- 9.5. A.M. Hansen, I.L.B. Olsen, E. Holst, O.M. Poulsen. **Validation of a high-performance liquid chromatography/fluorescence detection method for the simultaneous quantification of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons**. Ann. Occup. Hyg. 35 (6): 603-611, (1991).
- 9.6. P. Harvath. **Quantitative analysis of multiple PAHs in the coal conversion atmosphere**. Am. Ind. Hyg. Assoc., 40 (10): 739-745, (1983).
- 9.7. A. López, E. Blanco, J.I. García, A. Sanz. **Determination of some selected polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection**. Chromatographia 33 (5/6): 225-230, (1992).
- 9.8. D. López, S. Rubio, M.L. Polo. **Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons compounds in urban air particulate by HPLC with programmed fluorescence detection**. Química Analítica, 15: 224-229, (1996).
- 9.9. E. Marengo, M.C. Gennaro, C. Baiocchi, P.L. Bertolo. **Chromatographic separation of a mixture of polynuclear aromatic hydrocarbons with gradient elution**. Anal. Chim. Acta. 258: 93-97, (1992).
- 9.10. M.T. Urbietta, M.C. Fernández, B. Bilbao. **Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in tarmac used in laying roads by high-performance liquid chromatography with fluorescence detector**. Química Analítica 16: 253-258, (1997).
- 9.11. R. Williams, J. Meares, L. Brooks. **Priority pollutant PAH analysis of incinerator emission particles using HPLC and optimized fluorescence detection**. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 54: 299-314, (1994).
- 9.12. E. Yrjänheikki, L. Pyy, E. Hakala, T. Lapinlampi, A. Lisko, K. Vähäkangas. **Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a new coking plant**. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 56: 782-787, (1995).
- 9.13. [Real Decreto 363/1995](#) de 10 de Marzo (BOE de 5.6.95). **Reglamento sobre notificación de sustancias nuevas y clasificación, envasado y etiquetado de sustancias peligrosas**. Modificado el Anexo 1 por la Orden de 13.9.95 (BOE de 19.9.95)⁽¹⁾.
- 9.14. ISO 3696, **Agua para uso en laboratorio. Especificaciones**.
- 9.15. ISO 8655, "Partes 1 a 4". **Aparatos volumétricos de pistón y/o émbolo**.
- 9.16. ISO 3585, **Instalaciones de vidrio, tuberías y ajustes**. Propiedades del vidrio borosilicatado.
- 9.17. J.C. Miller y J.N. Miller " **Estadística para química analítica** " 2ª edición, 1993, Ed. Addison-Wesley iberoamericana, p.96.
- 9.18. M.T. Urbietta, I. Egiarte, E. Uria. **Optimization of the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in road asphalts by HPLC with fluorimetric detection**. Química Analítica 18: 197-202, (1999).

Anexo A

TABLA 1

Límites de detección de los HAPs calculados a partir de sus respectivas curvas de calibración y expresados en mg/ml de la disolución final de acetonitrilo

COMPUESTO	LÍMITE DE DETECCIÓN* ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
Naftaleno	0,04
1- Metilnaftaleno	0,01
2- Metilnaftaleno	0,3
Acenafteno	0,005
Fluoreno	0,01
Fenantreno	0,02
Antraceno	0,04
Fluoranteno	0,02
Pireno	0,02
Benzo (a) antraceno	0,04
Criseno	0,04
Benzo (e) Pireno	0,09

Benzo (b) fluoranteno	0,04
Benzo (k) fluoranteno	0,007
Benzo (a) pireno	0,05
Dibenzo (a,h) antraceno	0,03
Benzo (g,h,i) perileno	0,05
Indeno (1,2,3-c,d) pireno	0,02

* Calculado según el método de Miller y Miller (o.o.+3s_{x/y}) (9.17.).

TABLA 2
Estudio de Precisión, en términos de coeficiente de variación (C.V.), para dos niveles de concentración de cada HAP en acetonitrilo: 0,05 µg ml⁻¹ y 0,2 µg ml⁻¹

COMPUESTO	Concentración baja 0,05 µg ml ⁻¹		Concentración alta 0,2 (µg ml ⁻¹)	
	n° réplicas	C.V. (%)	n° réplicas	C.V. (%)
Naftaleno	7	2,4	7	3,4
Acenafteno	8	2,9	7	1,0
Fluoreno	8	2,1	7	0,99
Fenantreno	8	2,9	7	1,3
Antraceno	7	1,9	7	1,2
Fluoranteno	8	1,9	7	1,1
Pireno	7	5,7	6	3,0
Benzo (a) antraceno	7	2,0	7	0,79
Criseno	7	2,2	7	0,89
Benzo (e) pireno	7	4,1	7	0,58
Benzo (b) fluoranteno	8	2,9	7	1,4
Benzo (a) pireno	7	6,5	6	0,55
Dibenzo (a,h) antraceno	8	3,2	7	2,2
Benzo(g,h,i)perileno	7	8,5	6	2,0
Indeno (1,2,3-c,d) pireno	8	4,9	6	1,6

TABLA 3
Recuperaciones de HAPs en análisis inmediato para tres niveles de concentración en acetonitrilo bajo, medio y alto en filtros y tubos adsorbentes

Compuesto	Conc. baja	Recuperación (%) *		Conc. media	Recuperación (%) *		Conc. alta	Recuperación (%) *	
	(µg ml ⁻¹)	Filtro	Tubo	(µg ml ⁻¹)	Filtro	Tubo	(µg ml ⁻¹)	Filtro	Tubo
Naftaleno	0,201	103	**	0,403	92,2	**	0,805	84,8	**
1-Fluoronaftaleno	0,194	84,7	92,7	0,194	89,4	78,4	0,194	83,1	80,3
1-Metilnaftaleno	0,0275	97,7	119	0,0549	94,9	84,6	0,110	86,6	90,8
2-Metilnaftaleno	0,0340	101	118	0,0679	90,1	94,7	0,136	86,5	103
Acenafteno	0,208	97,7	113	0,415	98,4	89,0	0,831	86,1	85,0
Fluoreno	0,0475	93,8	95,2	0,0950	96,4	97,1	0,190	85,9	80,2
Fenantreno	0,0342	103	122	0,0684	107	101	0,137	84,0	84,6
Antraceno	0,00790	106	128	0,0158	100	94,3	0,0316	84,6	82,0
Fluoranteno	0,0764	94,7	102	0,153	99,7	91,8	0,306	85,3	75,7
Pireno	0,0847	102	94,4	0,169	91,0	96,7	0,339	66,8	70,4

B(a)A	0,0409	96,9	91,0	0,0818	95,2	94,6	0,164	77,8	73,2
Criseno	0,0367	95,0	101	0,0734	99,0	98,0	0,147	77,1	74,9
2,2'Binaftilo	0,266	89,4	91,9	0,266	109	98,9	0,266	97,9	85,5
B(e)P	0,0285	93,0	107	0,0571	98,0	96,7	0,114	77,0	75,1
B(b)F	0,0417	91,2	94,2	0,0834	95,4	93,9	0,167	77,6	74,4
B(k)F	0,0472	95,1	90,4	0,0944	93,5	95,3	0,189	79,8	74,4
B(a)P	0,0491	98,4	105	0,0982	92,6	89,9	0,196	73,5	73,5
D(a,h)A	0,0354	92,6	90,1	0,0708	98,2	91,3	0,142	70,0	73,9
B(g,h,i)P	0,0368	98,2	93,0	0,0736	93,6	92,5	0,147	66,5	77,0
I (1,2,3-c,d) P	0,0428	96,5	98,7	0,0856	99,4	95,5	0,171	83,5	71,3

* Promedio de tres determinaciones de cada muestra. Los coeficientes de variación (C.V.) son inferiores al 6% excepto para el Naftaleno, 1-Metilnaftaleno, 2-Metilnaftaleno, B(a,h)A, B(g,h,i)P e I(1,2,3-c,d)P que son inferiores al 17% (<17%).

** Se han detectado cantidades variables de Naftaleno en los blancos de los tubos adsorbentes.

TABLA 4
Recuperaciones en filtros y tubos adsorbentes de HAPs a tres niveles de concentración, después de 7 y 14 días de almacenamiento a 4 °C y a -25 °C

Compuesto	7 días												14 días			
	Concentración baja				Concentración media				Concentración alta				Concentración media			
	Filtros		Tubos		Filtros		Tubos		Filtros		Tubos		Filtros		Tubos	
	4°C	-25°C	4°C	-25°C	4°C	-25°C	4°C	-25°C	4°C	-25°C	4°C	-25°C	4°C	-25°C	4°C	-25°C
Naftaleno	***	***	**	**	***	20	**	**	***	11,6	**	**	***	14,2	**	**
1-Fluoronaftaleno	124	122	112	114	86,9	94,1	102	108	103	119	114	102	96,0	113	112	113
1-Metilnaftaleno	***	***	104	111	***	***	110	112	***	***	119	114	***	***	112	110
2-Metilnaftaleno	***	***	106	113	***	***	118	120	***	***	116	106	***	***	112	119
Acenafteno	***	***	113	106	***	***	117	101	***	14,7	122	111	***	***	93,2	105
Fluoreno	***	***	108	105	***	***	102	90,6	***	***	116	105	***	***	84,0	98,6
Fenantreno	34,2	104	109	103	9,68	52,7	111	98,4	12,8	87,8	125	113	***	***	105	104
Antraceno	30,6	95,7	108	105	17,2	50,6	86,2	89,1	13,7	77,1	111	99,3	***	***	84,6	98,7
Fluoranteno	50,9	93,9	105	103	35,2	75,9	96,4	86,1	45,5	99,0	102	109	35,2	68,5	80,5	91,0
Pireno	65,2	109	115	105	31,9	69,7	114	101	94,5	195	105	96,9	31,9	53,1	119	101
B(a)A	95,8	99	109	111	89,7	89,3	97,6	90,3	93,0	123	127	120	89,7	83,0	88,2	100
Criseno	102	109	110	117	89,0	92,0	106	89,0	96,1	123	131	117	89,0	81,1	91,5	103
2,2" Binaftilo	111	104	104	98,2	91,7	90,1	100	107	106	107	131	131	91,7	91,7	105	106
B(e)P	108	102	113	110	86,4	89,4	110	88,5	108	116	136	134	86,4	70,7	96,3	102
B(b)F	96,0	102	110	116	91,3	93,5	89,4	87,1	90,4	117	123	114	91,3	85,7	87,2	92,1
B(k)F	92,8	98,8	116	118	95,8	95,4	83,2	86,1	86,8	110	118	107	95,8	90,3	82,0	92,7
B (a) P	124	140	106	118	92,1	94,3	92,6	93,1	104	129	136	112	92,1	81,7	102	107
D(a,h)A	100	103	119	117	91,0	93,8	94,5	92,5	101	130	128	116	91,0	84,3	90,0	100
B(g,h,i)P	120	123	122	120	88,6	93,7	109	98,4	142	182	152	129	88,6	79,2	109	115
I(1,2,3-c,d)P	94,1	88,5	121	108	89,0	94,0	80,2	86,2	79,1	95,9	115	103	89,0	82,9	82,9	89,4

* Promedio de seis determinaciones de cada muestra.

** Se han detectado cantidades variables de Naftaleno en los blancos de los tubos adsorbentes.

*** La señal del compuesto en la muestra ha sido inferior a la señal de su límite de detección.* Promedio de seis determinaciones de cada muestra.

ANEXO B

Cálculo del volumen corregido V_{corr}

Las variaciones de presión y temperatura que pueden producirse, entre la calibración y la toma de muestra, pueden suponer variaciones en el volumen muestreado superiores al $\pm 5\%$. En este caso deben hacerse correcciones para paliar las desviaciones introducidas.

El volumen de aire muestreado, expresado en litros, en las condiciones ambientales de la toma de muestra se determina mediante la siguiente expresión:

$$V_{corr} = Q \times t \sqrt{\frac{P_1 \times T_2}{P_2 \times T_1}}$$

siendo:

V_{corr} volumen corregido en litros.

Q caudal de muestreo, en litros por minuto.

P_1 presión, en kilopascales, durante la calibración de la bomba de muestreo.

P_2 presión media, en kilopascales, durante la toma de muestra.

T_1 temperatura en grados Kelvin, durante la calibración de la bomba.

T_2 temperatura media, en grados Kelvin, durante la toma de muestra.

t tiempo de muestreo en minutos.

Para cualquier observación o sugerencia en relación con este Método puede dirigirse al

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo

Centro Nacional de Verificación de Maquinaria

Camino de la Dinamita, s/n Monte Basatxu-Cruces - 48903 BARACALDO (VIZCAYA)

Tfn. 944 990 211 - 9 44 990 543 Fax 944 990 678

Correo electrónico.- cnvminsh@mtas.es

ADENDA

Revisión normativa

La disposición siguiente han sufrido modificaciones después de la edición de este método en formato papel:

⁽¹⁾[Real Decreto 363/1995](#). Sufre periódicamente modificaciones por lo que es conveniente consultar los listados que en esta Web se trata de mantener actualizados