

EVALUACION DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLINUCLEARES POR CROMATOGRAFÍA LIQUÍDA DE ALTA EFICIENCIA Y DETECCION ULTRAVIOLETA

1. Omar Velásquez López, 2. José M. Martínez

RESUMEN

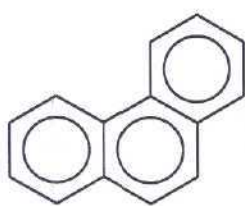
En este trabajo se presenta la metodología analítica implementada en nuestro laboratorio para evaluar hidrocarburos aromáticos polinucleares (PAH'S), usando la técnica de HPLC con detección a 254 nm. Se utilizó una columna ODS C18, 150 X 4 mm y 5 um de tamaño de partícula, un gradiente de elución de 30 - 90 % acetonitrilo - agua. El método desarrollado ofreció buena reproductibilidad y buenos límites de cuantificación. Se pudieron determinar 10 hidrocarburos aromáticos polinucleares.

ABSTRACT

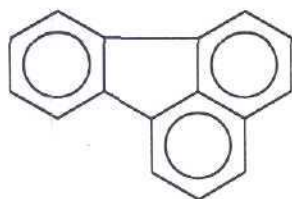
A method for the evaluation of aromatic polinuclear hydrocarbons has been tried using high performance liquid Chromatography with a detection wave length of 254 nm. An ODS C18, 150 X 4 mm and 5um particle size, elution gradient of 30 - 90 % acetonitrile - water mobile phase. Ten PAH'S were possible of evolution with great reproducibilities and quantification limits.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. PAH), son contaminantes de alta peligrosidad que por su difícil degradación por procesos naturales, a su toxicidad y propiedades carcinogénicas, teratogénicas y mutagénicas, su estudio, determinación y caracterización merece especial cuidado. Estos hidrocarburos al ser introducidos al ecosistema por diferentes causas, se esparcen rápidamente y muy pocas partes del mundo no están afectadas por estos contaminantes y de allí que sean considerados contaminantes ambientales ubicuos¹.



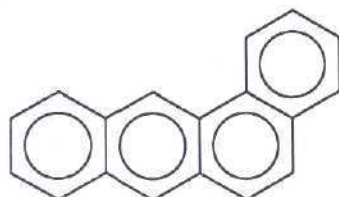
Fenantreno



Fluoranteno



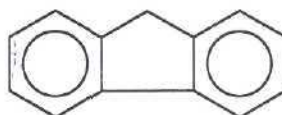
Pireno



Benzo[a]Antraceno

LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

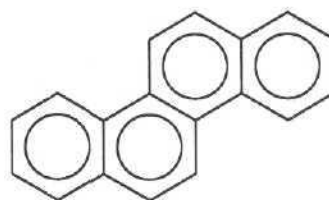
La fusión de dos o más anillos de benceno origina este tipo de compuestos. En este trabajo se determinan un conjunto de diez hidrocarburos aromáticos. La figura 1 muestra las estructuras de los PAH determinados en este trabajo.



Fluoreno



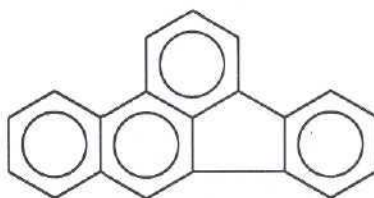
Antraceno



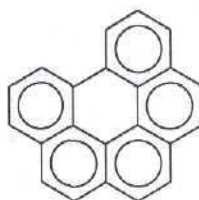
Criseno



Benzo[a]Pireno



Benzo[b]Fluranteno



Benzo[ghi]Perileno

Figura 1 Estructuras de los diez PAH separados en este estudio

IMPACTO AMBIENTAL DE LOS PAH SOBRE EL ECOSISTEMA MARINO.

La contaminación por PAH y sus efectos físicos, químicos y biológicos son consecuencia inevitable de la producción, uso y transporte mundial del petróleo y sus productos (50% de la descarga total de hidrocarburos al mar), de la utilización de vehículos a motor de petróleo (Por Ej. Un vehículo produce alrededor de 50 µg/L de B[a]P por Km. recorrido, las aeronaves emiten típicamente 10 mg de B[a]P por minuto de recorrido). Además también están presentes en el humo de cigarrillo, en aceites lubricantes usados y pueden generarse como subproductos de combustión².

Sólo es suficiente una concentración de 50 µg/L de PAH totales sobre una amplia zona marina para afectar seriamente las larvas de algunos organismos marinos. Estos compuestos pueden causar la muerte entre un 51 y 96% de los corales en caso de derrame³⁻⁴.

TOXICIDAD

Los PAH se caracterizan por su persistencia y propiedades mutagénicas, teratogénicas y carcinogénicas¹. Donde la teratogénesis se refiere a la aparición de defectos de nacimiento originados por el daño a las células embrionarias o fetales o por las mutaciones en las células de los óvulos o el esperma, la mutagénesis es la alteración en el DNA produciendo cambios hereditarios y la carcinogénesis ocurre cuando sustancias químicas xenobóticas causan una incontrolada replicación celular (cáncer).

El Benzo[a]Pireno (BaP) es reconocido como uno de los más peligrosos de este grupo ya que está ampliamente distribuido y es extremadamente carcinogénico.

En una evaluación sobre su toxicidad en la piel de ratones, se notó que la dosis de actividad sensible fue de 5.6×10^5 mmol, se observó daño pulmonar y teratogenicidad. Durante 10 meses se inyectó intra-traquealmente 0,05 mg de éste compuesto en ratas, produciendo tumores pulmonares en el 28% de los animales².

METABOLISMO

La principal ruta metabólica de los PAH es la formación de los óxidos de areno los cuales se isomerizan a fenoles. (Figura 2). En mamíferos, incluyendo al hombre, la ingestión de estas sustancias inducen cambios en las enzimas citocroma p-450 en el retículo endoplasmático, que están situadas principalmente en el hígado, pero además en los riñones, pulmones e intestinos. Los óxidos y fenoles formados en esta ruta se conjugan con las moléculas solubles en agua, como el tripéptido glutation-glutamil cistenil glicina, entonces son excretados².

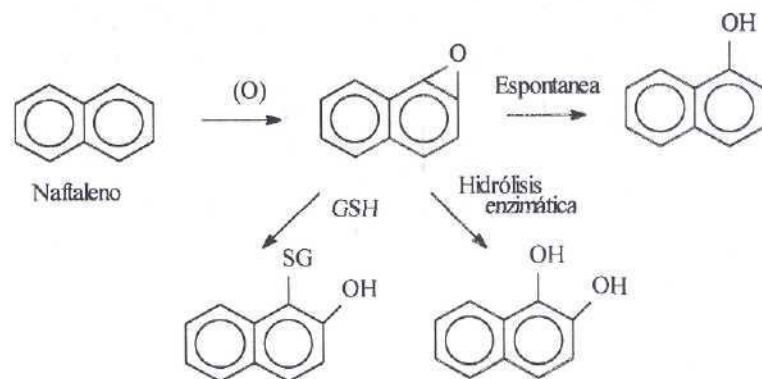


Figura 2 Metabolismo oxidativo del naftaleno.

TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PAH

HPLC

La cromatografía es la técnica dominante para la identificación y cuantificación de este tipo de compuestos, como HPLC fase reversa con detector fluorescente y UV/Vis^{1,2,6,21}, cromatografía de gases con detector de ionización de llama^{15,16,20,22,26}, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas^{12,15,16-20,24,28-31}.

Espectrofluorimetría de alta resolución de Shpol'skii, este método consiste en incrustar los PAH en una matriz de policristales de n-alcenos sometidos a bajas temperaturas (10 K) y son caracterizados por sus espectros de fluorescencia obteniéndose estructuras casi lineales (efecto de Shpol'skii). El uso de este efecto de fluorescencia proporciona gran selectividad y alta sensibilidad³².

Otras técnicas como la determinación gravimétrica e infrarroja se han empleado. La utilización de la espectroscopia UV también permite determinar cualitativamente la presencia de PAH'S³³.

La cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, es la forma más popular de la cromatografía, líquida para separar PAH porque proporcionan una excelente selectividad.

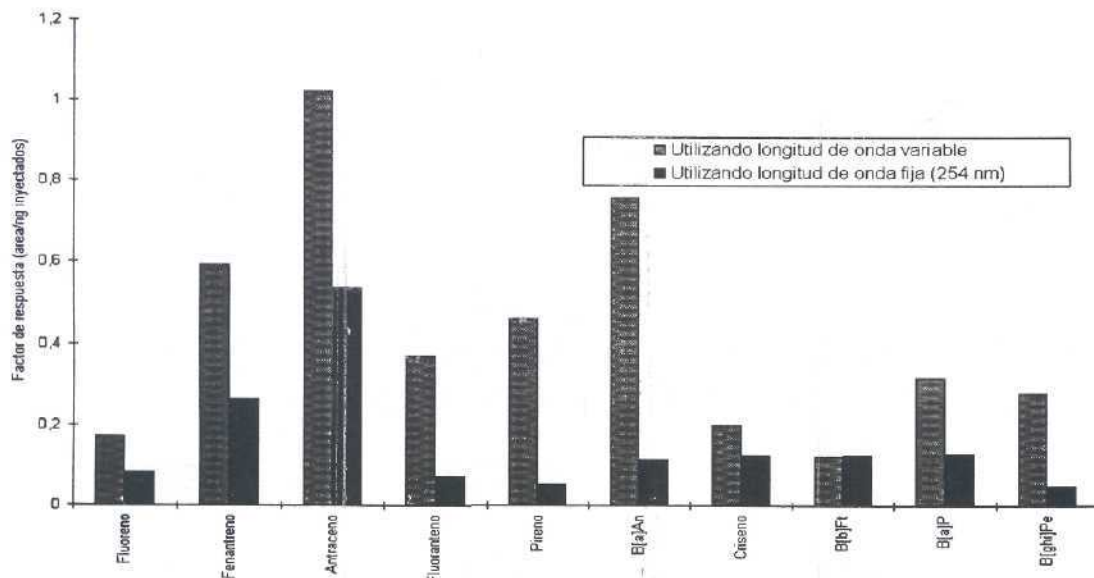
Los PAH absorben intensamente luz ultravioleta por lo que el detector UV es muy sensible a sus sistemas conjugados extendidos. El espectro de los PAH está caracterizado por una estructura vibracional fina, muestran tres bandas de absorción, (e_1 , e_2 y B), originadas por las transiciones $p \rightarrow p^*$. Al aumentar el número de anillos condensados en la serie de! aceno (lineales), la absorción se desplaza progresivamente a longitudes de onda mayores hasta llegar a la región visible mientras que los compuestos policíclicos angulares, los áfenos, también muestran un desplazamiento batocrómico de su sistema de tres bandas con el incremento en el número de anillos, pero el incremento es menor que para los acenos³⁴.

Los PAH'S cubren un amplio rango de retención y su separación puede lograrse mediante la elución isocrática pero el tiempo empleado es largo, lo que implicaría un mayor consumo de solvente, además de un mayor ensanchamiento de banda de los últimos picos en eluir, por esto se prefiere la elución en gradiente.

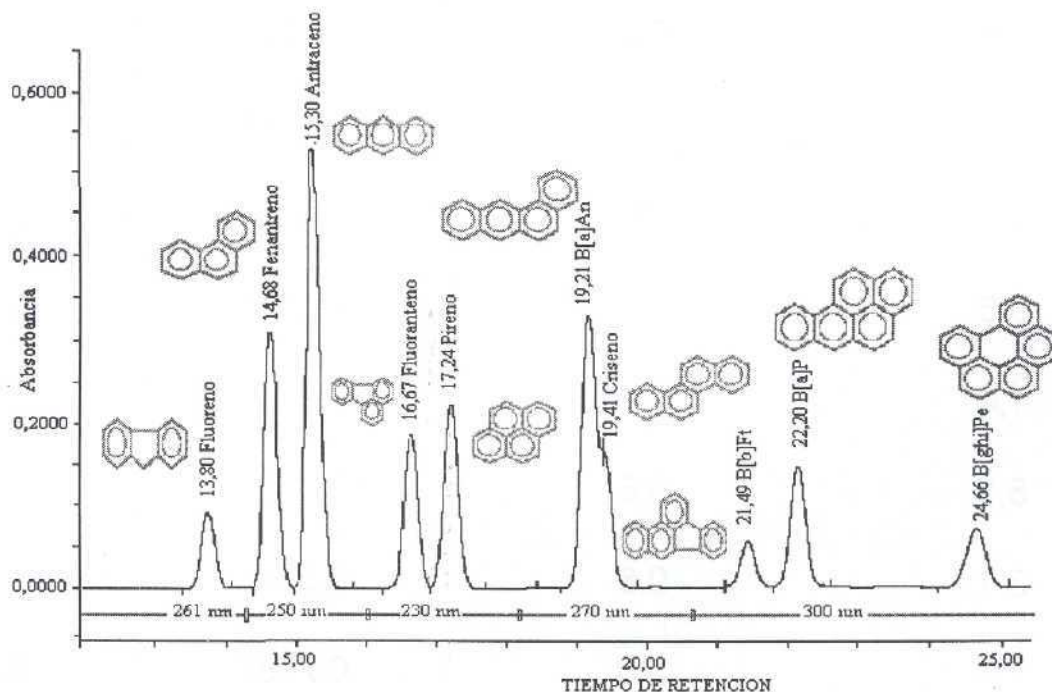
La adición de ciclodextrinas a la fase móvil afecta la separación de los PAH ocasionando una disminución en el coeficiente de capacidad y la mejor resolución de isómeros, aunque en la década pasada los métodos de HPLC empleaban las ciclodextrinas como fases estacionarias ligadas.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos solubles en agua pero que contienen cavidades hidrofóbicas en las cuales pueden encapsularse moléculas huésped para formar complejos de inclusión, un ejemplo de estos tipos de compuestos es la variedad de complejos ciclodextrinas-PAH^{6,7}.

COMPARACIÓN DE LOS FACTORES DE RESPUESTA UTILIZANDO LONGITUD DE ONDA FIJA Y VARIABLE



CROMATOGRAMA BAJO LAS CONDICIONES OPTIMAS ESTABLECIDAS



CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS ÓPTIMAS PARA LA SEPARACIÓN DE LOS DIEZ PAH ESTUDIADOS.

Columna	ODS C ₁₈ (150x4 mm) 5 µm de tamaño de partícula	
Volumen de Inyección	10 µL	
Flujo	1 mL/min.	
Gradiente de Elución	Tiempo (min.)	AcN (%)
	0	30
	20	90
Detección UV	Tiempo (min.)	(nm)
	0	261
	14	250
	16	230
	18	270
	20	300

PAH	Limite de cuantificación (ng. Inyectados)	Limite de detección (ng. Inyectados)	Factor de respuesta (Área/ng.iny.)	r (n=14)
F	5,0	1,0	0,1732	0,9997
Fen	0,9	0,5	0,5937	0,9998
An	0,6	0,2	1,0222	0,9995
Ft	2,0	1,0	0,3689	0,9989
Pi	1,7	1,0	0,4610	0,9997
Cri	3,5	0,8	0,1997	0,9995
B[a]An	1,0	0,8	0,7578	0,9992
B[b]Ft	5,1	0,8	0,1222	0,9992
B[a]P	2,1	0,8	0,3164	0,9991
B[ghi]Pe	2,6	2,0	0,2787	0,9988

CONCLUSIONES

La columna C₁₈ empleada permitió separar todos los PAH estudiados utilizando un sistema de elución en gradiente, claro que el par B[a] An y criseno tuvieron una pobre resolución, pero el integrador no tuvo problema en diferenciarlos e integrarlos independientemente uno de otro, esto lo demuestra en que la reproducibilidad de las señales de este par de compuestos es buena. Esta columna además permitió la elución de todos los 10 PAH en un tiempo menor que el reportado por varios investigadores^{16,21}.

Los límites de detección y el rango lineal se ven seriamente afectados por la longitud de onda bajo la cual se hizo el análisis, mientras que para el antraceno el límite de detección es de 0,3 ng. inyectados y la amplitud del rango lineal es de 400 para el B[ghi]Pe, que a 254 nm no presenta su máximo de absorción, su límite de detección es de 3 ng. inyectados además de una considerable reducción en la amplitud de su rango lineal. Este problema se ve disminuido con la variación de la longitud de onda durante la corrida cromatográfica.

El método por su buena reproducibilidad, con valores de desviación estándar relativa menores del 3% permite arrojar buenos resultados para su posterior utilización en la determinación de estos hidrocarburos en matrices ambientales.

BIBLIOGRAFÍA

- Ogan, K., Katz, E. and Siavin W. *Anal. Chem.*, **1979**, 51, 1315.
- ALLOWAY, B. J, and AYRES, D. C.** Chemical Principles of Environmental Pollution, Blackie Academic & Professional. London, 1994, p 206-10.
- GESAMP:** Grupo Mixto de Expertos OMI/ FAO/ UNESCO/ OMM/ OMS/ OIEA/ Naciones Unidas/PNUMA. Sobre los Aspectos Científicos de la Contaminación del Mar, El Estado del Medio Marino: Informes y Estudios del Programa de Mares Regionales del PNUMA No. 115. PNUMA1990,23.
- GESAMP:** OMI/ FAO/ UNESCO/ OMM/ OMS/ OIEA/ United Nations/PNUMA Impact of Oil and Related Chemicals on The Marine Environment. Reports and Studies No. 50 London. GESAMP, 1993, 1-83
- GRASSHOF,** Klaus. Methods of Seawater Analysis. Weinheim: Verlag Chemie. 1976. p 227-34.
- Husain, N.; Christian, A. Y. and Warner, I. M. *J. Chromatogr.* **1995**, 699, 73-83
- Mákelá, M. and Pyy, L. *J. Chromatogr.* **1995**, 699, 49-57.
- Fladung, C. N. *J. Chromatogr.* **1995**, 692, 21-26
- Brouwer, E. R.; Hormans, A. N.; Lingerman, J. H. and Brinkman, U. A. *J. Chromatogr.* **1994** 669, 45-57.
- Wenclawiak, B. Wand Hees T. *J. Chromatogr.* **1994**, 660, 61-5.
- WALDBRONN ANALYTICAL DIVISIÓN, Analysis of polynuclear Aromatic Hydrocarbons by high-performance liquid-chromatography, HEWLETT PACKARD, 1994, 14p.
- Gere, D. R.; Knipe, C. R.; Casteíli, P.; Hendrick, J.; Randall, L. G. and Schulenberg-Schell H. *J. Chromatogr. Sci.* **1993**, 31, 246-56.
- Blanco, E. G.; Garcia, J. Y. and Mendel, S.
- Blanco, E. G.; García, J. Y. and Mendel, S.
- Samhan, O.; Literathy, P.; Al-Hashash, H.; Moulin, L.; Soced, T.; Al-Matrouk, K. and Martin Bouyer, M *Fresenius J. Anal. Chem.* 1991,339, 699-715

- Lee, H., Dookhran, G. and Chau, A. S. *Analyst*, 1987, 112,31,
Wise, S. A. and May, W. E. *Anal. Chem.*, **1983**, 55, 1479.
Dunn, P. P. and Armour, R. *J. Anal. Chem.*, 1980,52,2027.
Das, B. S. and Thomas, G. H. *Anal. Chem.*, **1978**, 50, 967.
May, W. E.; Chesler, S. N.; Cram, S. P.; Gump, B. H.; Hertz, H. S.; Enagonio, D. P. and Dyszei, S. M. *J. Chromatogr. Sci.* **1975**, 13, 535-40.
Schmit, J. A.; Henry, R. A.; Williams, R. C. and Dieckman, J. F. *J. Chromatogr. Sci.* **1971**, 9,641.
Rebbert, R. E.; Chesler, S. N.; Guenther, F. R.; Kosier, B. J. and Parris, R. M. *Fresenius. J. Anal. Chem.* 1992, 342 (1-2), 20-38
Paschke, A.; Herbel, W. and Steinhart, H. *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1992**, 15, 827-33.
Señante, M. M.; Benner, B. A.; Chesler, S. N.; Koster, B. J.; Heen, K. E. and Stone, S. F. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **1990**. 338 (4), 501-14
Junk, G. A. and Richard J. *J. Anal. Chem.* **1988**, 60, 451.
Hilpert, L. R.; May, W. E.; Wise, S. A.; Chesler, S. N. and Hertz, H. S. *Anal. Chem.*, **1978**, 50, 458.
UNICAM APPLICATION REPORT. Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's) in Marine Sediments, Cambridge, UNICAM, 1995, 6p.
Anchi, A. P.; Varney, M. S. and Phillips, J. *J. Chromatogr.* **1991**, 542, 413.
Onuska, F. Y. and Terry, K. A. *J. High. Resolut. Chromatogr.* **1989**,12, 362.
Yunker, M. B.; Fowler, B. R. and Smyth, T. V., *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 1333-43.
Theobald, N. *Anal. Chim. Acta.*, **1988**, 204, 135.
Saber, A; Moel, G. C; Paturel, L; Jarosz, J.; Martin-Bouyer, M. and Vial, M. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **1991**, 339(10),716-21
Large, R. *Analytical Proceedings.* **1991**, 28,263
SILVERSTEÍN, R. M.; BASSLER, G. C. and MORRIL, T. C. Spectrometric Identification of Organic Compounds. 5^{ed}. John Wiley & Sons. Singapore. 1991, p. 289-311.