



MÁSTER EN TÉCNICAS EXPERIMENTALES EN QUÍMICA

PNT_MTEQ
Rev3
04/12/2023
Pag. 1 de 5

Asignatura: **Técnicas cromatográficas y afines. Acoplamiento de técnicas**
PRÁCTICA 3: Determinación del contenido terpénico en muestras comerciales de aceite esencial del árbol del té mediante GC-MS

PRÁCTICA 3: DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TERPÉNICO EN MUESTRAS COMERCIALES DE ACEITESENCIAL DEL ÁRBOL DEL TÉ MEDIANTE GC-MS

ÍNDICE	Pag.
1.- Objetivo	2
2.- Fundamento de la técnica/metodología	2
3.- Instrumentación	2
4.- Prevención de riesgos	2
5.- Material y reactivos	3
6.- Metodología experimental	3
7.- Obtención de resultados	5
8.- Elaboración del informe	5
9.- Bibliografía	5

Elaborado por: Daniel Gallart Mateu	Revisado por: Yolanda Martín Biosca Miriam Beneito Cambra M ^a Jesús Lerma García	VºBº Francesc Esteve Turrillas Director del Master
Fecha / firma:	Fecha / Firma:	Fecha / Firma:



MÁSTER EN TÉCNICAS EXPERIMENTALES EN QUÍMICA

PNT_MTEQ
Rev3
04/12/2023
Pag. 2 de 5

Asignatura: **Técnicas cromatográficas y afines. Acoplamiento de técnicas**
PRÁCTICA 3: Determinación del contenido terpénico en muestras comerciales de aceite esencial del árbol del té mediante GC-MS

1.- Objetivo

El árbol del té (*Melaleuca alternifolia*) es un árbol relativamente pequeño, que crece en suelos de alta calidad en la región costera del este de Australia, donde las lluvias son abundantes. Crece cerca de pantanos, marismas y en las orillas de los ríos Clarence y Richmond del noreste de Nueva Gales del Sur y el sur de Queensland.

El género *Melaleuca alternifolia* está representado por aproximadamente 250 especies, la mayoría de ellas de Australia. Sin embargo, la demanda del mercado por su aceite esencial ha incentivado el cultivo en otros países como Brasil, India, Kenia, Sudáfrica, Estados Unidos (California) y Guatemala.

Los monoterpenos, sesquiterpenos y sus alcoholes relacionados son los principales componentes del aceite de árbol de té y brindan beneficios médicos para tratamientos antisépticos y antifúngicos, al igual que actúan como antioxidantes. De todos ellos, el terpinen-4-ol, es el principal principio activo al que se atribuyen las propiedades medicinales, antibacterianas y antifúngicas del aceite esencial de árbol de té.

La caracterización y determinación del contenido terpénico en este tipo de muestras son necesarias con el fin de identificar el tipo y procedencia del aceite del árbol de té y evitar posibles fraudes.

2.- Fundamento de la técnica/metodología

La volatilidad de los terpenos presentes en un aceite esencial permite su análisis por cromatografía de gases, siendo esta técnica la más empleada para su identificación y determinación. Con este fin, se utilizan tanto los detectores de ionización de llama como los de masas, si bien, son estos últimos los más empleados debido a las elevadas especificidad y selectividad de la espectrometría de masas, que permiten identificar y diferenciar los terpenos presentes en una muestra a partir de sus espectros de masas.

En esta práctica se utilizará la cromatografía de gases junto con la espectroscopía de masas en el modo de trabajo *full scan*, para la identificación de los terpenos presentes en una muestra comercial de aceite de árbol del té, con ayuda de bibliotecas espectrales. Una vez realizada la identificación de los analitos presentes en la muestra, se determinarán sus concentraciones utilizando el modo de trabajo *selected ion monitoring* (SIM) utilizando para ello las masas características de las especies a determinar que se habrán seleccionado previamente a partir de sus espectros de masas.

3.- Instrumentación

- Cromatógrafo de gases Trace 1600 (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas de simple cuadrupolo ISQ 7610 (Thermo Scientific).

4.- Prevención de riesgos

- Leer el documento Normas generales de seguridad en el laboratorio.
- Revisar la etiqueta de los reactivos, en particular las consideraciones de seguridad.
- Localizar el recipiente de residuos correspondiente a esta práctica y vaciar todas las disoluciones generadas en él.
- Adoptar las precauciones y medidas de seguridad necesarias para el manejo del hexano



MÁSTER EN TÉCNICAS EXPERIMENTALES EN QUÍMICA

PNT_MTEQ

Rev3

04/12/2023

Pag. 3 de 5

Asignatura: **Técnicas cromatográficas y afines. Acoplamiento de técnicas**
PRÁCTICA 3: Determinación del contenido terpénico en muestras comerciales de aceite esencial del árbol del té mediante GC-MS

5.- Material y reactivos

• Material:

- Vasos de precipitados
- Matraces aforados (5 y 10 mL)
- Micropipetas de 20, 100, 200 y 1000 μL
- Cuentagotas o pipetas Pasteur
- Viales y tapones para CG
- Encapsulador

• Reactivos:

- Hexano
- Disolución patrón multicomponente concentrada (ya preparada)
- Disolución de 2-clorofenol de 50 mg mL^{-1} (patrón interno, ya preparada)

6.- Metodología experimental

6.1.- Método cromatográfico e identificación de analitos en modo de trabajo Full Scan

- Se desarrollará el método cromatográfico (bajo la supervisión del profesor/a) empleando las condiciones cromatográficas que se indican en la tabla 1.

Tabla 1.- Condiciones instrumentales del método cromatográfico en modo Full Scan

Tipo de columna	HP-5MS (o equivalente)
Inyector	200°C, splitless, 1 μL
Temperatura de la fuente de ionización	276°C
Temperatura del detector	150°C
Flujo de He (gas portador)	1.0 mL min^{-1}
Programa horno cromatográfico	60°C durante 5 min 10°C min^{-1} hasta 133°C 60°C min^{-1} hasta 230°C
Modo de medida	Full Scan, 50-300 m/z

- Preparar una dilución 1/200 en hexano de la disolución patrón multicomponente concentrada y registrar el cromatograma de esta (sin patrón interno).
- A partir del cromatograma obtenido, los espectros de masas correspondientes y con la ayuda de la biblioteca espectral, identificar los analitos presentes en la muestra. Para cada compuesto, anotar sus masas características y el tiempo de retención.

6.2.-Preparación de la curva de calibrado

- Calcular la concentración de los analitos presentes en la disolución patrón multicomponente inicial preparada a partir de la pesada de los correspondientes patrones comerciales, disolución y posterior dilución a 10 mL con hexano. Considerar la identificación de los analitos realizada previamente (apartado 5.1), el cromatograma mostrado en la Figura 1, los datos de masas pesadas proporcionados por el profesor/a y los valores de riqueza de los patrones comerciales (99% para A, B y C, 97% para D y 95% para E).



MÁSTER EN TÉCNICAS EXPERIMENTALES EN QUÍMICA

PNT_MTEQ

Rev3

04/12/2023

Pag. 4 de 5

Asignatura: **Técnicas cromatográficas y afines. Acoplamiento de técnicas**
PRÁCTICA 3: Determinación del contenido terpénico en muestras comerciales de aceite esencial del árbol del té mediante GC-MS

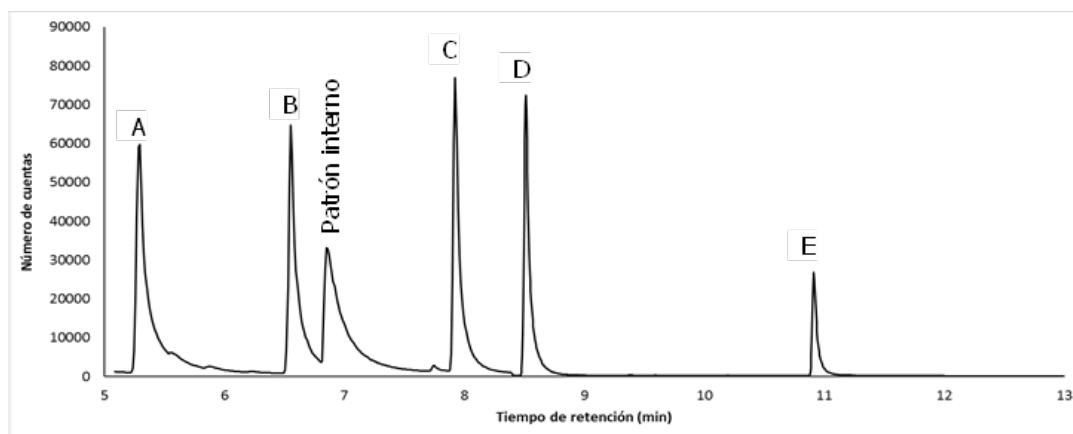


Figura 1.- Cromatograma obtenido para la disolución de patrón multicomponente en las condiciones mostradas en la tabla 1.

- Una vez conocidas las concentraciones iniciales de los analitos, preparar una curva de calibración de seis puntos, en un intervalo de concentración entre 0.05 mg L^{-1} y 1 mg L^{-1} . La preparación de estas disoluciones se realizará siempre en hexano, empleando matraces aforados de 5 mL. Se añadirá a cada uno de estos matraces 100 μL de la disolución de patrón interno de 50 mg mL^{-1} .

6.3.- Método de medida en modo SIM.

- A partir del método en modo Full Scan, se desarrollará el método cromatográfico en modo SIM. Para ello, se tendrán en cuenta las masas características seleccionadas previamente para cada compuesto junto con la masa 128.0 m/z para el patrón interno (con supervisión del profesor/a).

6.4.- Preparación de las muestras.

- Para la preparación de la muestra de aceite del árbol del té se pesará, en balanza analítica y matraz aforado de 10 mL, una masa de 10 mg, que se disolverá y llevará a 10 mL con hexano.
- Teniendo en cuenta que la concentración máxima del analito mayoritario suele ser del orden de 30-40 % (m/m), calcular las diluciones necesarias para medir la muestra en el intervalo de trabajo definido con anterioridad. Así mismo, preparar una disolución 10 veces más concentrada que la calculada para el analito mayoritario para cuantificar los analitos minoritarios. Ambas disoluciones se prepararán en matraces aforados de 5 mL, y se les añadirá 100 μL de la disolución de patrón interno de 50 mg mL^{-1} .
- La muestra se preparará por duplicado de pesada.
- Tomar 1 mL de cada una de las disoluciones preparadas (calibrado y muestras) e introducirlos en viales de cromatografía de gases.

6.5.- Medida de las disoluciones.

- Empleando el método cromatográfico en modo SIM antes desarrollado, crear una secuencia de medida que incluya tanto la curva de calibración como las muestras (con supervisión del profesor/a). Se realizará una única inyección por vial.



MÁSTER EN TÉCNICAS EXPERIMENTALES EN QUÍMICA

PNT_MTEQ
Rev3
04/12/2023
Pag. 5 de 5

Asignatura: **Técnicas cromatográficas y afines. Acoplamiento de técnicas**
PRÁCTICA 3: Determinación del contenido terpénico en muestras comerciales de aceite esencial del árbol del té mediante GC-MS

6.6.- Validación de la metodología.

- Obtener a partir de las expresiones del calibrado los parámetros de validación: límite de detección instrumental (LOD) y límite de cuantificación (LOQ). Así mismo, obtener la sensibilidad y linealidad junto la precisión en la medida de las muestras.

7.- Obtención de resultados

- Para la obtención de los resultados se calculará la señal relativa correspondiente tanto para patrones como para muestras. Para ello se dividirá en cada caso el área del analito en cuestión entre el área del patrón interno correspondiente en cada uno de los cromatogramas.
- La concentración de cada uno de los terpenos en la muestra se obtendrá por interpolación en el calibrado y teniendo en cuenta las diluciones realizadas a la muestra y la masa pesada, expresando el resultado como porcentaje en masa (% m/m).

8.- Elaboración del informe

La memoria debe incluir los siguientes aspectos:

- Resultados obtenidos en el estudio de los analitos en el modo de trabajo *Full scan*.
- Datos de la curva de calibración y parámetros de validación derivados de la misma.
- Resultados obtenidos en el análisis de las muestras muestra, con una estimación de la incertidumbre asociada a cada resultado calculada a partir de las medidas de las réplicas.

9.- Bibliografía

- Gallart-Mateu, D., Rodriguez-Sojo, S., de La Guardia, M., Determination of tea tree oil terpenes by headspace gas chromatography mass spectrometry, Anal. Methods 8 (23) (2016) 4576-4583.
<https://doi.org/10.1039/C6AY00923A>.