
Seminario de Cromatografía de gases: técnicas avanzadas y acoplamiento con la espectrometría de masas.

Técnicas cromatográficas y afines. Acoplamiento de técnicas

M:U. Técnicas experimentales en Química

Departamento de Química Analítica



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Curso 2023-2024

PRÁCTICA 1.- Optimización multivariante de la composición de la fase móvil en cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa. Aplicación a la separación cromatográfica de vitaminas hidrosolubles

PRÁCTICA 2.- Identificación de compuestos típicos en aceites esenciales comerciales mediante GC_FID

PRÁCTICA 3.- Determinación del contenido terpénico en muestras comerciales de aceite esencial del árbol del té mediante GC-MS

PRÁCTICA 1.- Optimización multivariante de la composición de la fase móvil en cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa. Aplicación a la separación cromatográfica de vitaminas hidrosolubles



OBJETIVO

encontrar o deducir con el mínimo esfuerzo experimental (mínimo número de experimentos) un valor óptimo de una variable respuesta (y), que depende de variables experimentales controlables (X), denominadas factores

$y \rightarrow$ Resolución cromatográfica

$X \rightarrow$ pH, concentración de tampón, modificador orgánico en la fase móvil

DISEÑO EXPERIMENTAL OPTIMIZACIÓN

ESTRATEGIA INTERPRETATIVA

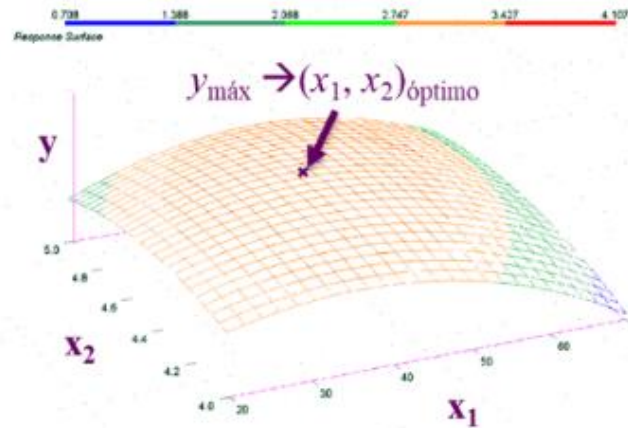
- Se realizan **experimentos preestablecidos** en los que se varían los valores de los factores
- Se estima un modelo empírico $y - X$
 - Permite deducir los **valores óptimos de los factores**
 - Permite interpretar el **efecto de los factores en la respuesta**

TERMINOLOGÍA

SUPERFICIE DE RESPUESTA

Representación 3-D de la respuesta en función de los factores que influyen sobre ella

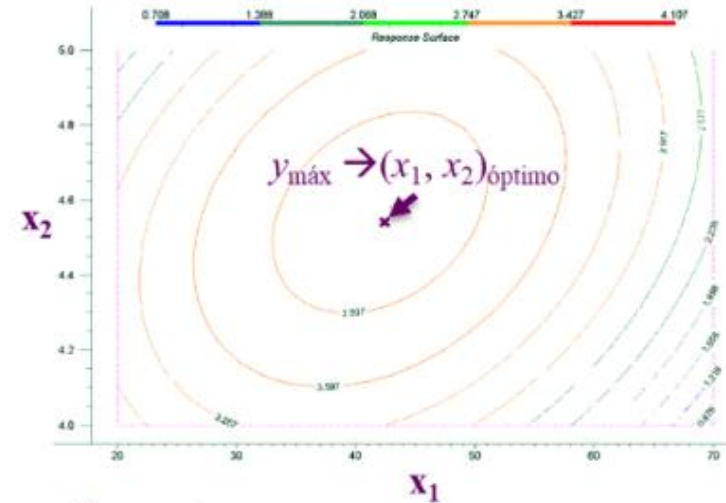
$N_f = 2$



CURVAS DE NIVEL

Representación 2-D de la superficie de respuesta. Las curvas cerradas unen los puntos de igual respuesta

$N_f = 2$



Si $N_f > 2 \rightarrow$ Ej. $N_f = 3 \rightarrow$ gráfica $y=f(x_1, x_2)$ para $x_3 = \text{cte}$

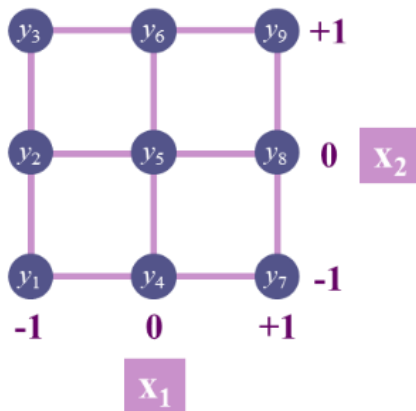
$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2$$

Separación de vitaminas
hidrosolubles

DISEÑO FACTORIAL DE
TRES NIVELES ($nf = 3$)

2 FACTORES {
pH de la fase móvil
% ACN

Número de experimentos: $Ne = 3^{Nf}$ $\xrightarrow{Nf=2}$ $Ne = 3^2 = 9$

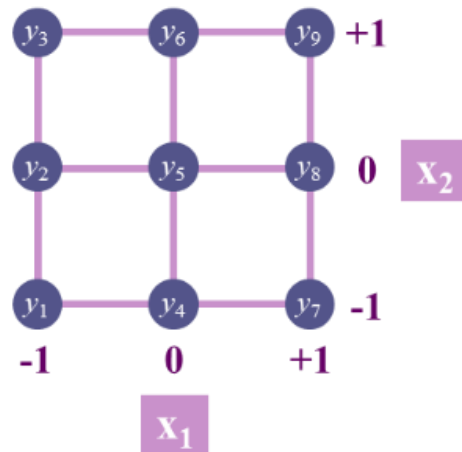


Experimentos antes de aleatorizar

Ne	X		y
	x_1	x_2	
1	-1	-1	y_1
2	-1	0	y_2
3	-1	+1	y_3
4	0	-1	y_4
5	0	0	y_5
6	0	+1	y_6
7	+1	-1	y_7
8	+1	0	y_8
9	+1	+1	y_9

Separación de vitaminas hidrosolubles

- Caso **A**: B₂ y B₉
- Caso **B**: B₂ y B₇
- Caso **C**: B₂ y B₁₂
- Caso **D**: B₇ y B₉
- Caso **E**: B₂ y B₆



- 1) A partir de los datos del Anexo I (**estructura, pK_a, logP, datos de retención**), establecer los valores de los **niveles -1 y +1** de los factores en estudio
- 2) Establecer el **nivel de los factores** a estudiar con la ayuda de Statgraphics
- 3) **Preparar las fases móviles**
- 4) **Inyectar** cada una de las disoluciones en el cromatógrafo con cada una de las fases móviles preparadas.
- 5) Obtener el **tiempo de retención** y la **resolución**
- 6) Encontrar la **composición de la fase móvil que proporcione la máxima resolución** entre los compuestos con la ayuda de Statgraphics

CROMATOGRAFO DE GASES

Suministro de gas: He, N₂, aire e H₂, dependiendo del detector utilizado. El suministro puede ser en botellas, o mediante generadores de gases, ya que el N₂ se puede concentrar a partir del aire, y el H₂ se puede generar por electrólisis del agua

Inyector de muestra, con regulación independiente de temperatura.

La **columna**, de relleno o capilar.

Horno de columnas con control independiente de temperatura.

Detector, o detectores si se usa un primer detector no destructivo seguido de otro montado en serie.

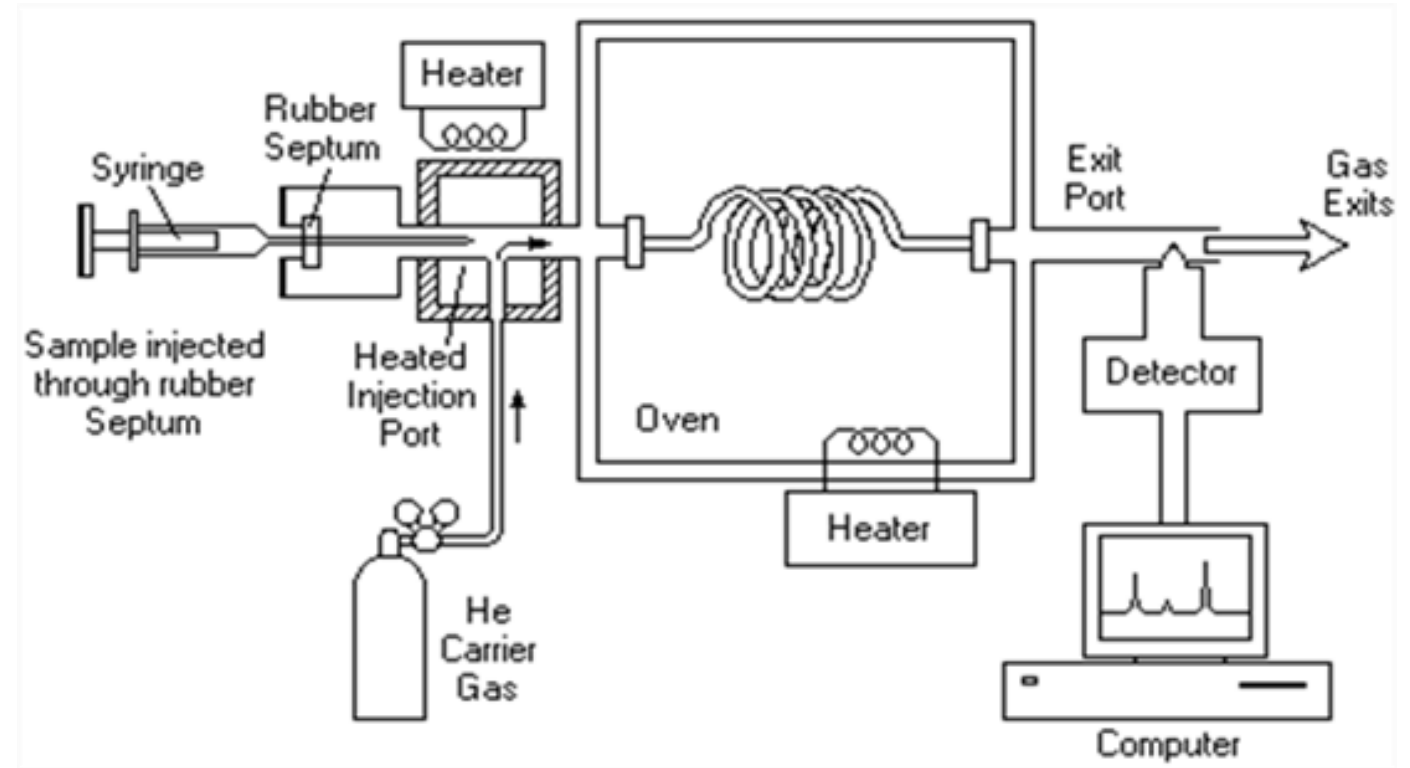
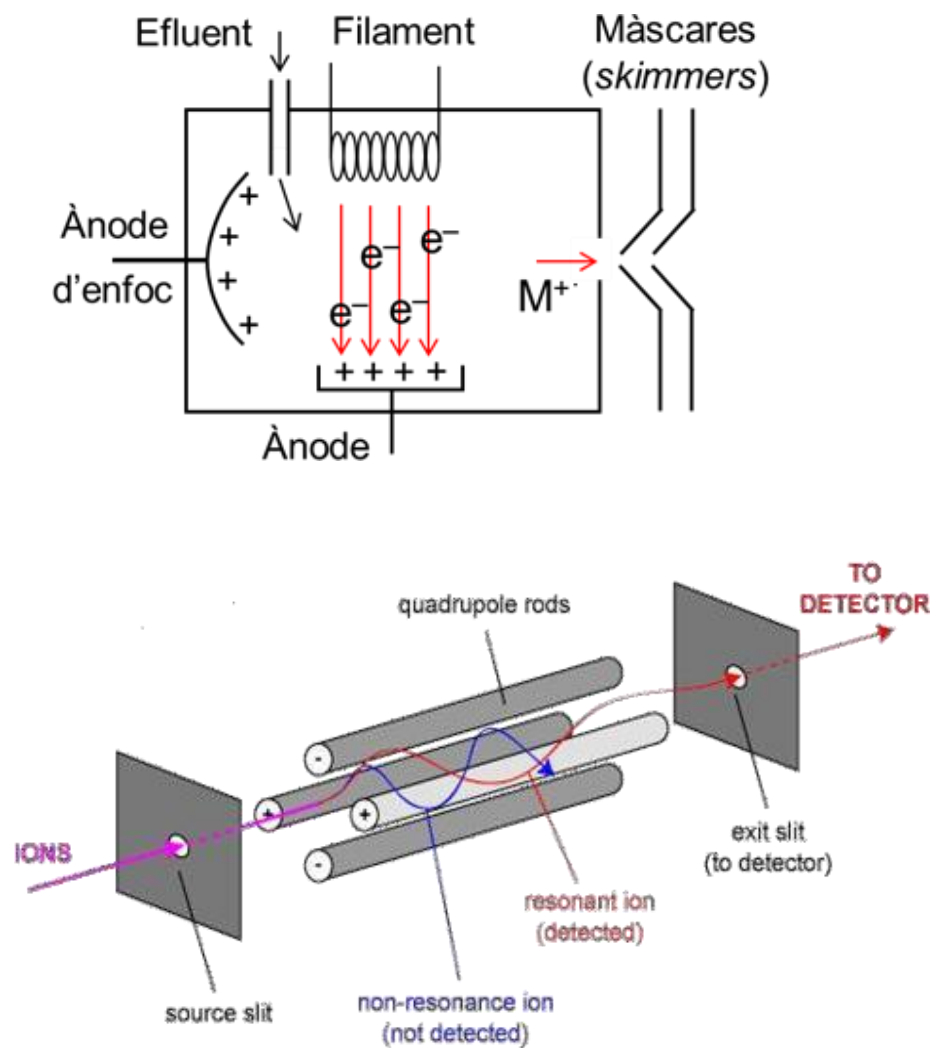
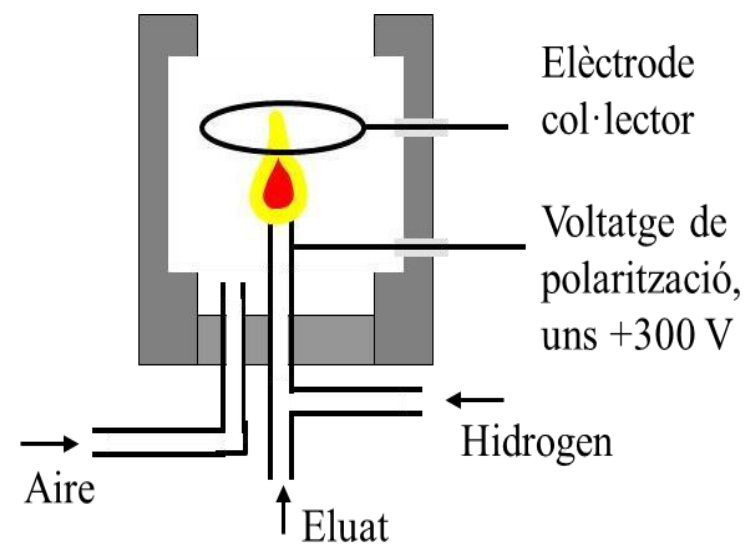


Figura 2. Componentes de un cromatógrafo de gases

DETECTOR DE MASAS



DETECTOR FID



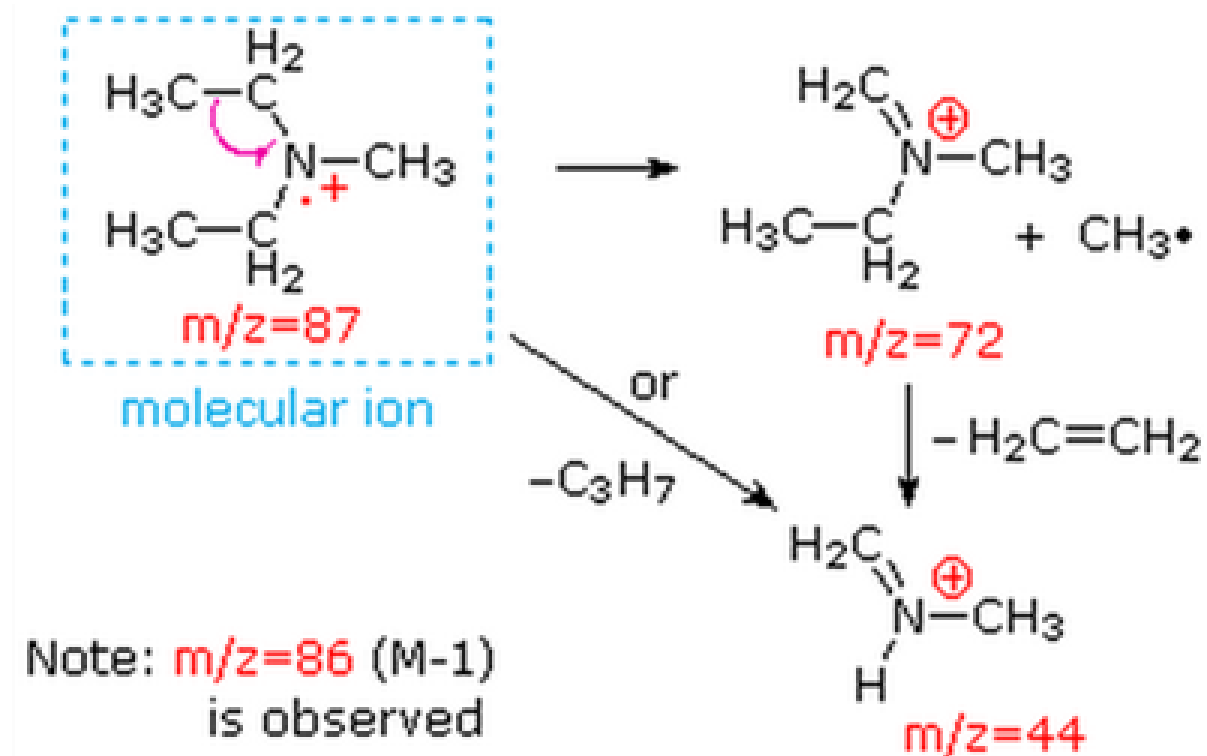
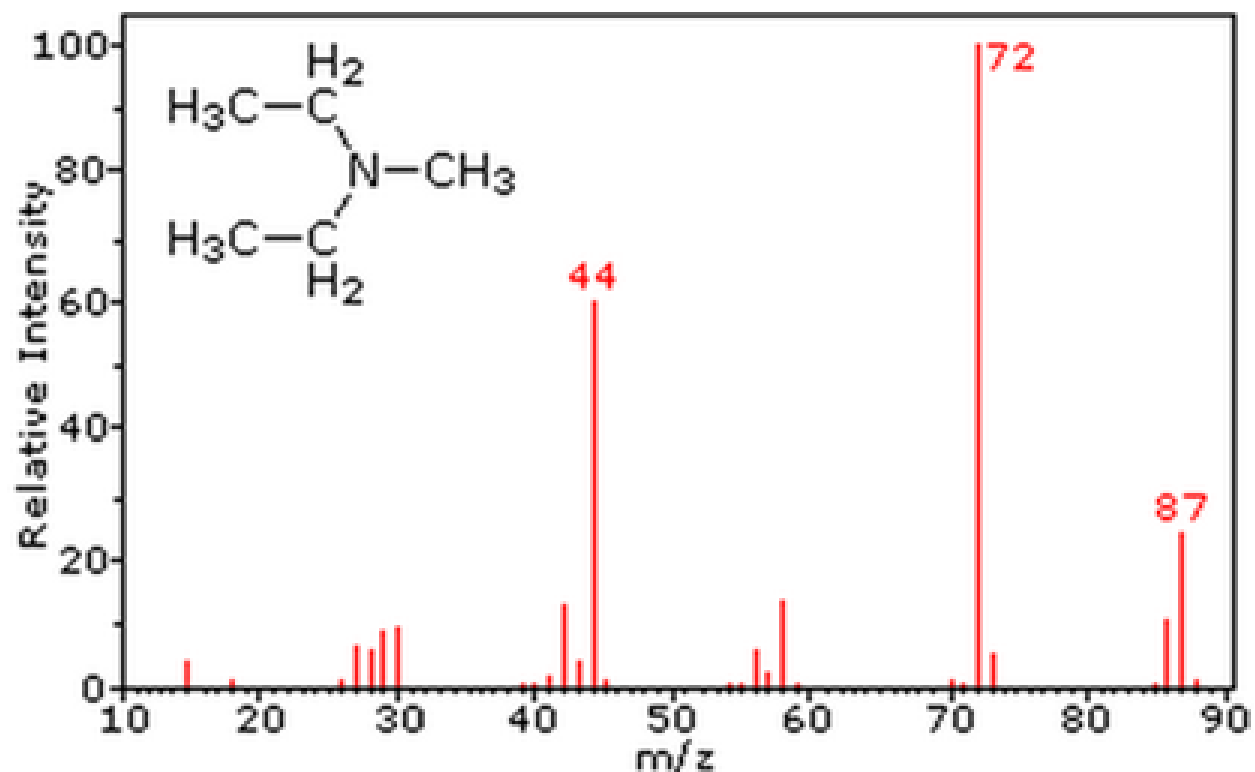


Fig. 23. Espectro de masas de N, N-dietilmetilamina y su fraccionamiento en fase gas

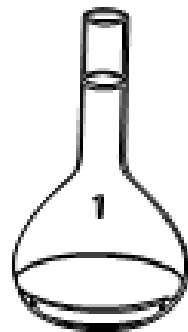
Práctica 1. Determinación del contenido terpénico en muestras comerciales de aceite esencial del árbol del té mediante GC-MS

1. Desarrollo del método cromatográfico en *Full Scan*, identificación de analitos y método SIM.

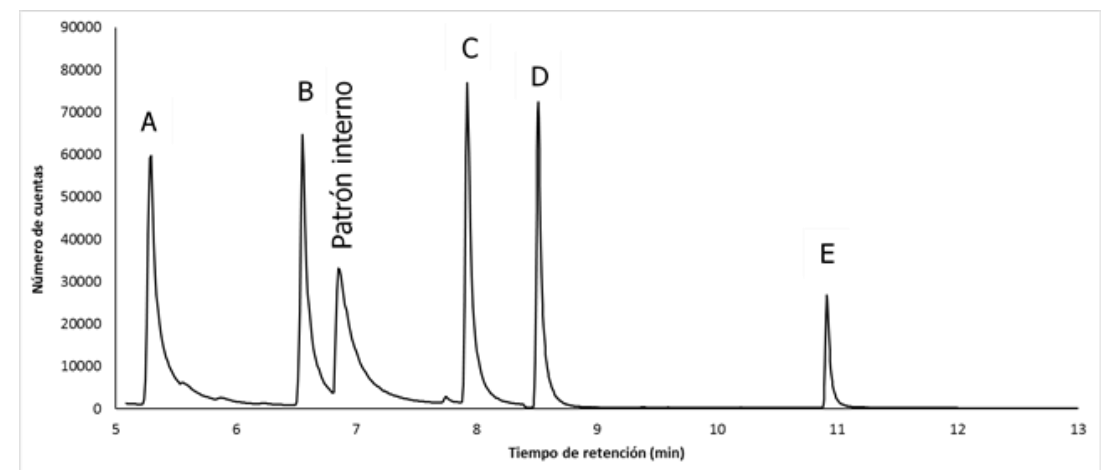
Tipo de columna	HP-5MS (o equivalente)
Inyector	200°C, 1 µL, splitless
Temperatura de la fuente de ionización	276°C
Temperatura del detector	150°C
Flujo de He (gas portador)	1.1 mL min ⁻¹
Programa horno cromatográfico	60°C durante 5 min 10°C min ⁻¹ hasta 133°C 60°C min ⁻¹ hasta 230°C

Disolución
madre

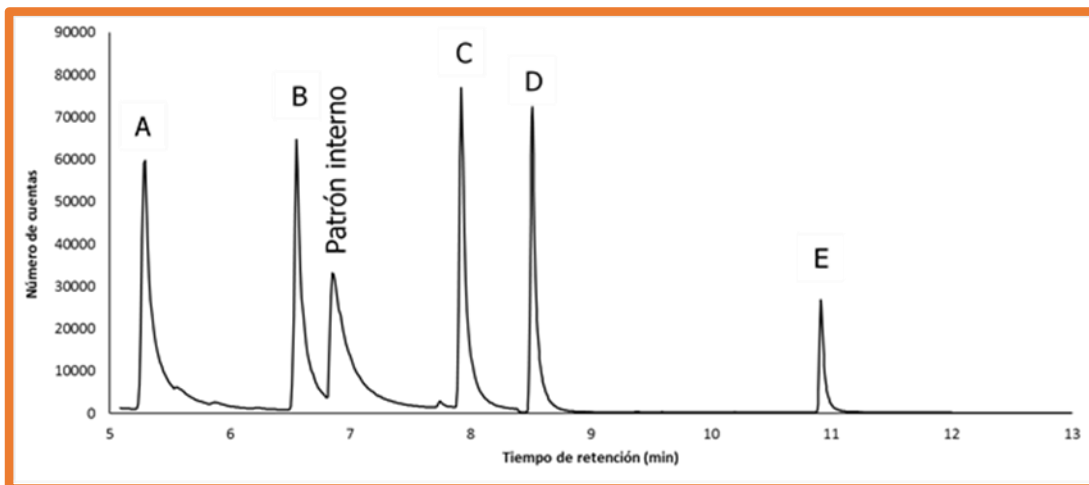
Dilución
1/200



GC-MS



CROMATOGRAMA



Identificación de los analitos presentes:
A, B, C, y D



Selección de las masas características
de cada analito

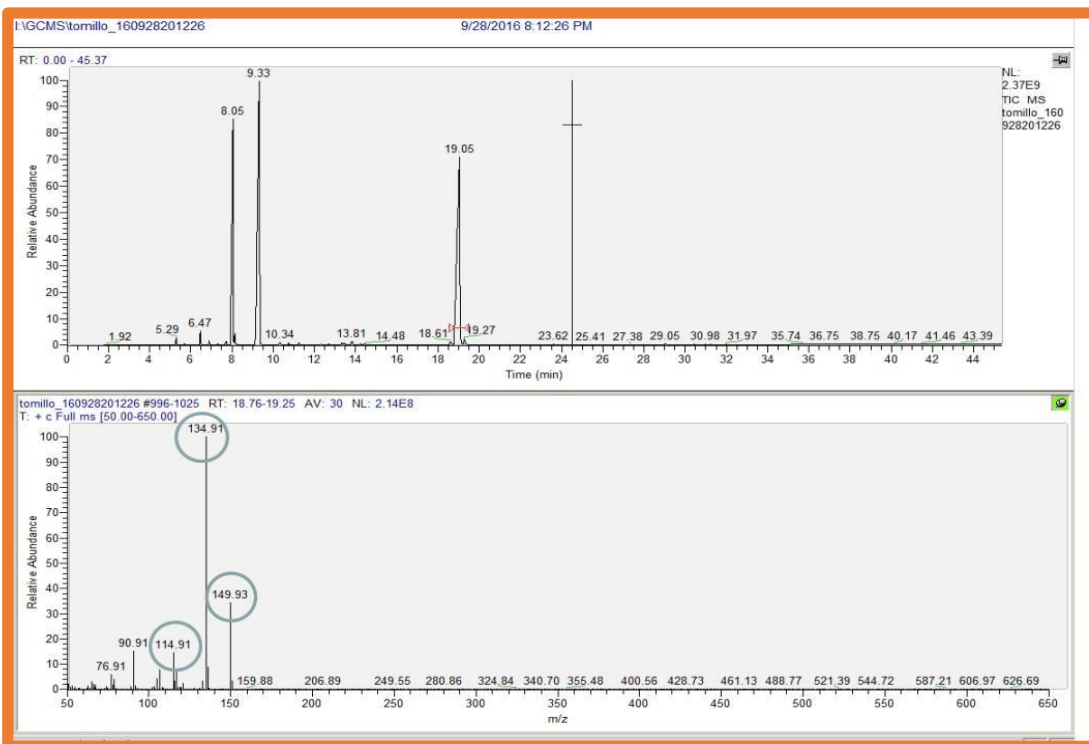


Selección de las masas características
de cada analito



Método modo SIM

ESPECTROS DE MASAS



2. Preparación de curvas de calibrado.

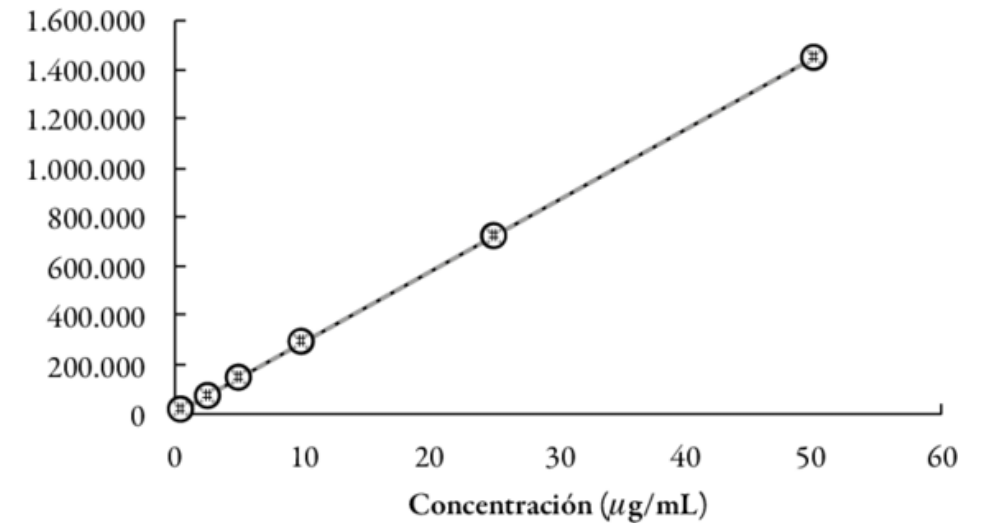
A partir de las **masas pesadas de patrón**, sus **riquezas** y sabiendo el **volumen final** (5 mL).



¿Qué concentración de cada analito tiene la disolución madre?



Calibrado de 5 puntos y volumen final (5 mL).



2. Preparación de muestras.



10 mg $\xrightarrow[5 \text{ y } 10 \text{ mL}]{\text{Dilución en hexano}}$ ¿cuanto hay que diluir?

Componente mayoritario: 30-40%

Tanto los patrones como las muestras:
100 μL disolución de patrón interno (2-clorofenol)

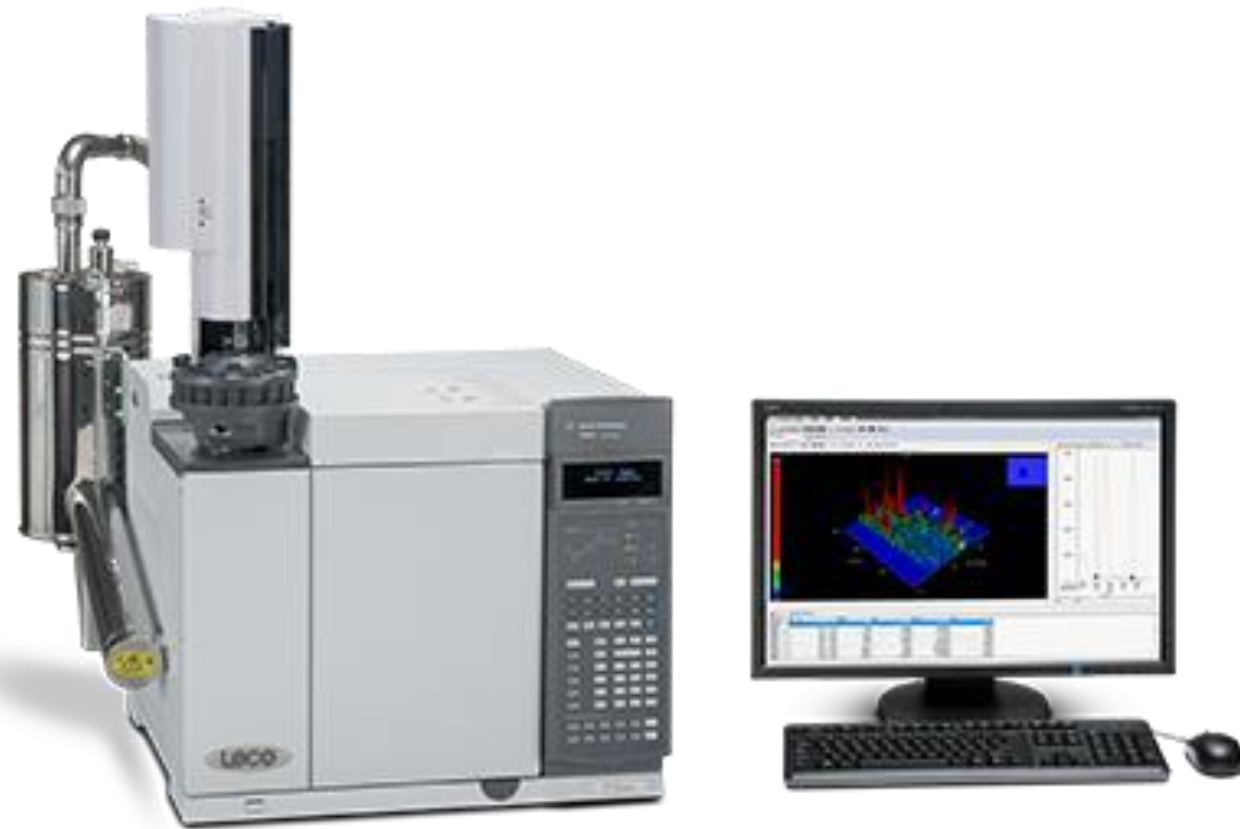


GC-MS

Práctica 2. Identificación de compuestos típicos en aceites esenciales comerciales mediante GC-FID

1. Desarrollo del método cromatográfico.

Tipo de columna	HP-5 (o equivalente)
Inyector	250°C, 1 µL, split 1:10
Temperatura del detector	290°C
Flujo de N ₂ (gas portador)	2.5 mL min ⁻¹
Programa horno cromatográfico	Tª inicial durante 1 min. 15°C min ⁻¹ hasta 290°C mantenido 2 min.



2. Disoluciones de medida.

- Disolución patrón hidrocarburos lineales C₁₀-C₄₀
- Disolución de la muestra
- Mezcla patrón:muestra (50:50)



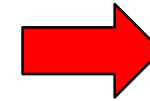
Así...

Kovats retention index formula:

$$RI = 100 (n) + 100 (m - n) \frac{tri - trn}{trm - trn}$$

Where:

- RI = retention index of “i”
- **i = constituent of essential oil that is being analyzed**
- n = carbon number of the alkane which elutes before “i”
- m = number of carbons of the alkane which elutes after “i”
- tri = retention time of “i”
- trn = retention time of the alkane which elutes before “i”
- trm = retention time of the alkane which elutes after “i”



Obtener los índices de retención experimentales por ambas estrategias.



Comparación con datos tabulados de bibliografía (NIST, papers,...).