

MODULO 3

**Parte I
CONTENIDO**

✓ **Cromatografía Gaseosa**

**Disertante:
Prof. María Rosa Repetti**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

Componentes de un Cromatógrafo de gases

Características de las muestras

Inyectores/Columna/Detectores

Espectrometría de masa

Espectrometría de masa en tándem (TQ)

INTRODUCCIÓN

La cromatografía es un proceso que se puede utilizar para separar los diversos componentes de una mezcla.

En química analítica, la cromatografía de gases (CG, GC) se utiliza para separar y analizar compuestos que pueden evaporarse sin descomponerse.

Se emplea GC para realizar análisis cualitativo y cuantitativos de los analitos volátiles.

El Cromatógrafo de gases, utiliza una fase móvil y una fase estacionaria. Es decir, un gas transporta la muestra a lo largo de un soporte estacionario (columna, una pieza de vidrio o metal) ubicado en el interior del instrumento.

INTRODUCCIÓN

La CG se utiliza para separar compuestos polares y no polares que sean volátiles

Aplicaciones:

- Plaguicidas
- Bipenilos policlorados
- Polibromados
- Etc.

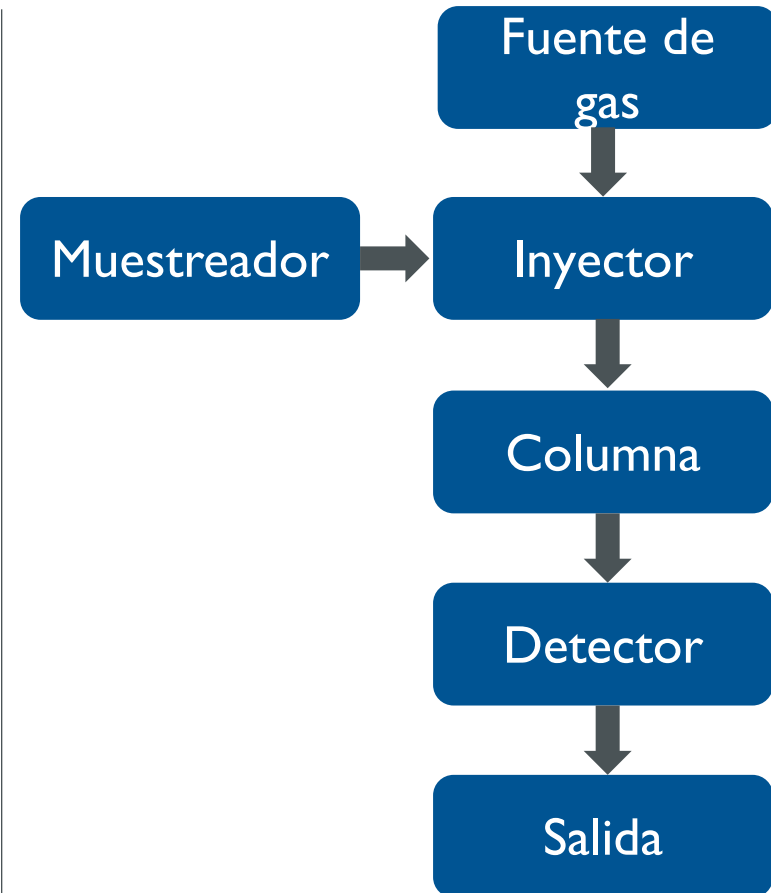
Si un compuesto no es volátil (como sucede con las proteínas, las sales y los polímeros), en ese caso la cromatografía de gases NO será una técnica de separación adecuada.

- ✓ **Deben ser volátiles**
- ✓ **800 umas**
- ✓ **No descomponerse con la temperatura**

CONFIGURACIÓN DE UN SISTEMA: Cromatógrafo de Gases

Un cromatógrafo de gases consta de los siguientes elementos:

- Una fuente de gas portador regulado y purificado, que hace avanzar la muestra por el instrumento.
- Un inyector, que también actúa como vaporizador de las muestras líquidas.
- Una columna, en la que se produce la separación en función del tiempo.
- Un detector, que genera una respuesta en forma de cambio de su salida eléctrica a medida que los componentes eluyen de la columna.
- Salida: interpretación de datos



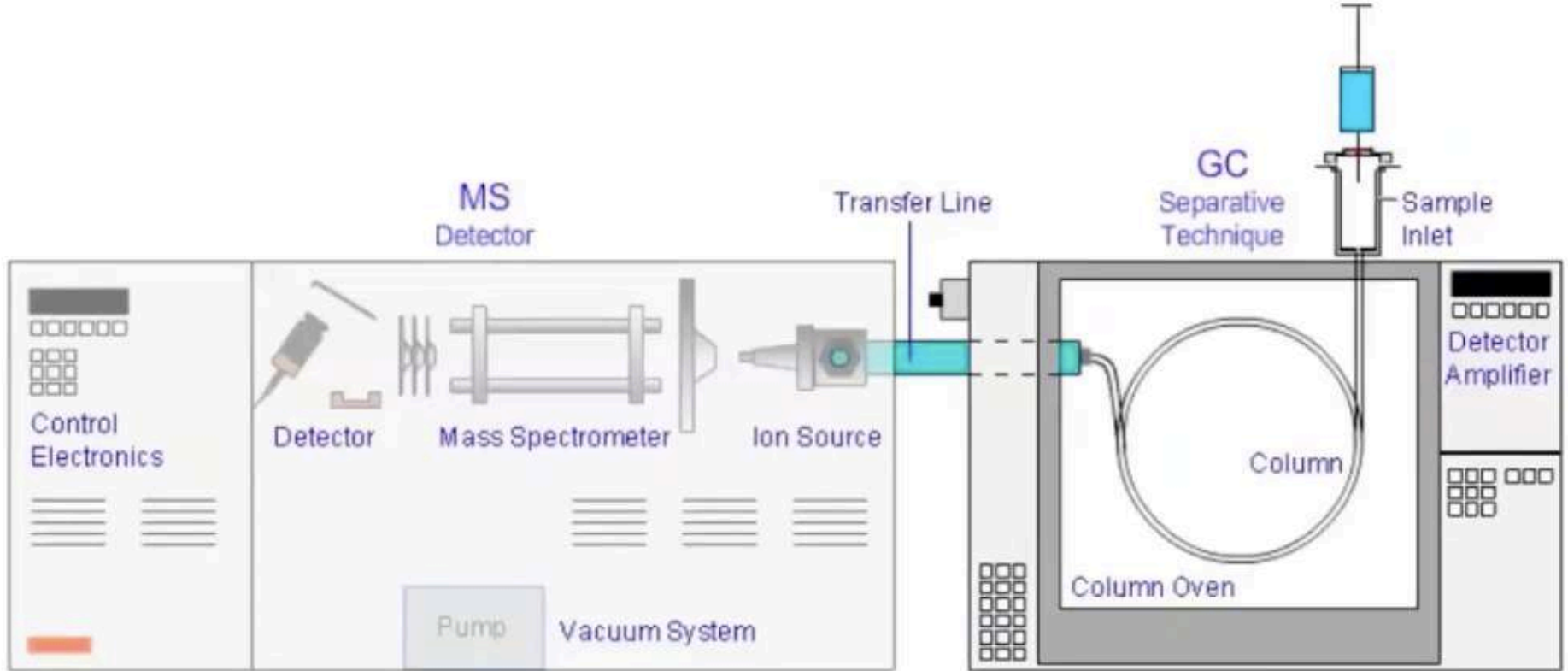


RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe

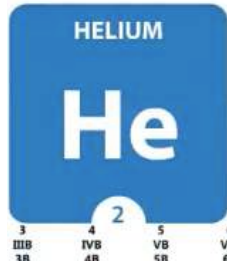


Esquema de un sistema GC-MS

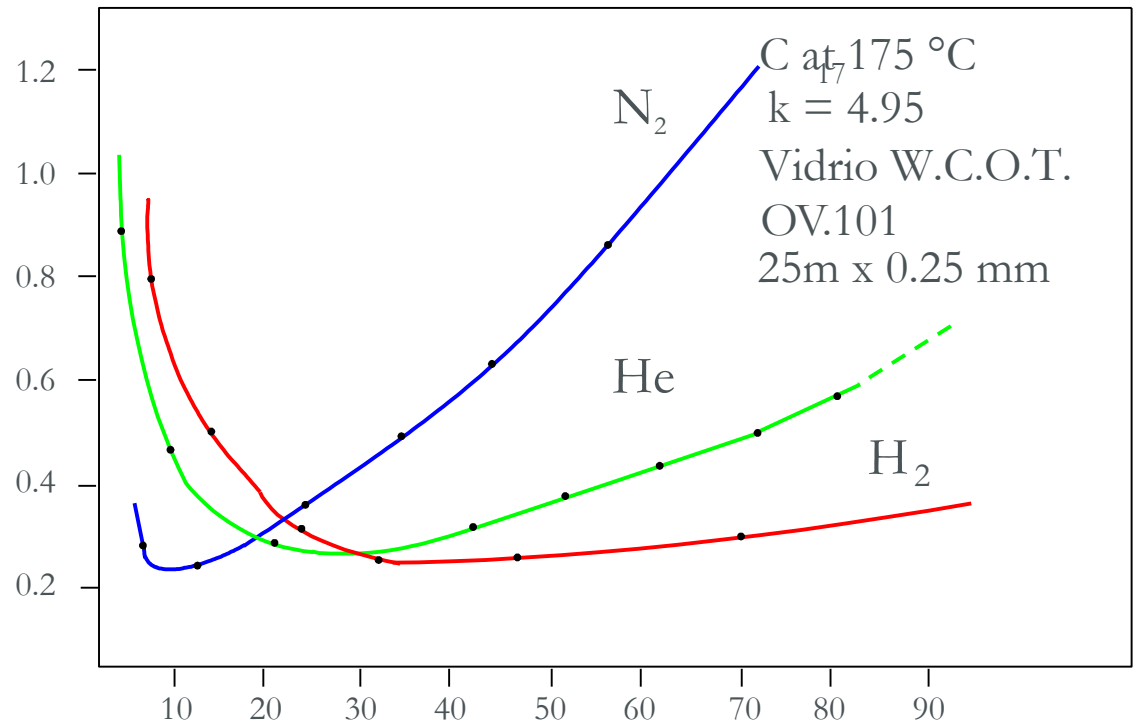


Tipo de gas portador

Hidrógeno
Helio
Nitrógeno



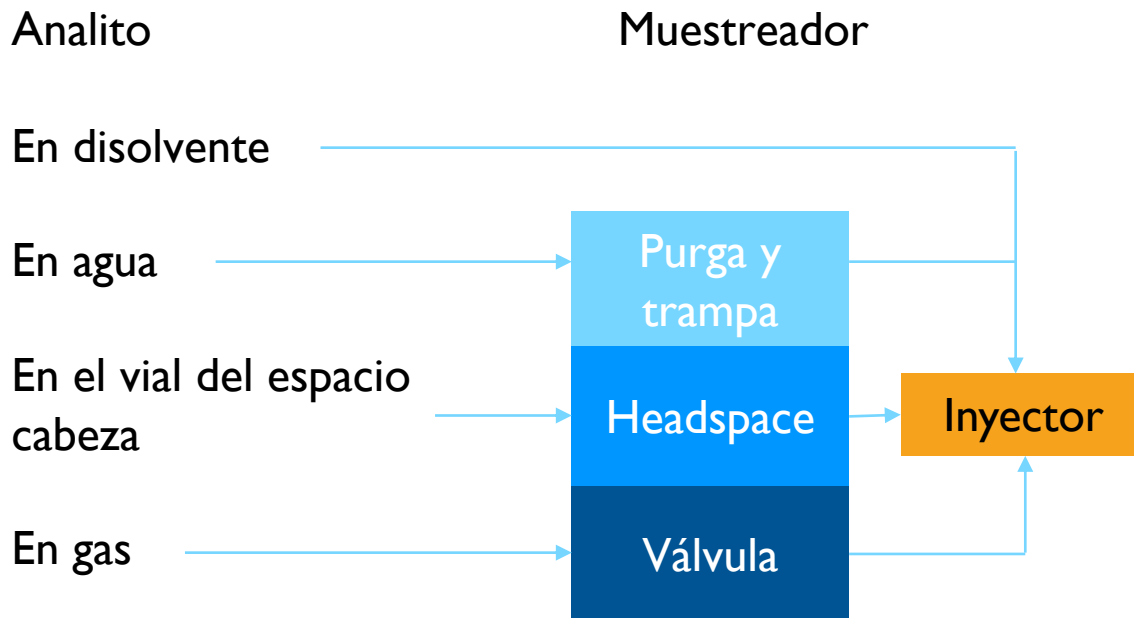
HETP
(mm)



Pureza cromatográfica

Muestreador: introducción de muestras

La elección del muestreador es determinada por la matriz:



Muestreador automático para GC



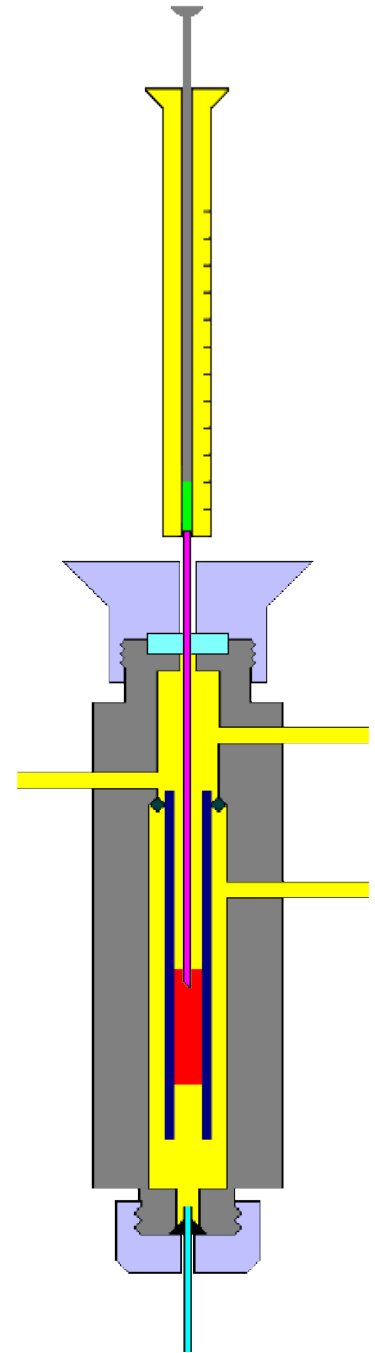
Muestreador headspace

Inyector

La muestra se introduce en la corriente de gas portador a través de un septum por medio de:

- Jeringa de líquido o de gas
- Válvulas de muestreo, Headspace y Purga&Trampa
- Loop que está insertado mecánicamente en la corriente de gas portador

Se utilizan diferentes válvulas para los líquidos y los gases debido a los diferentes volúmenes de muestra





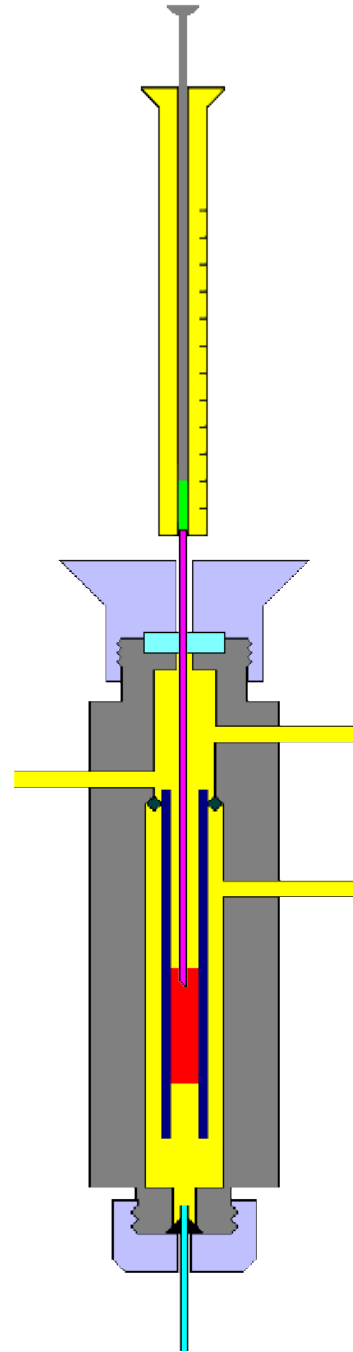
RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe



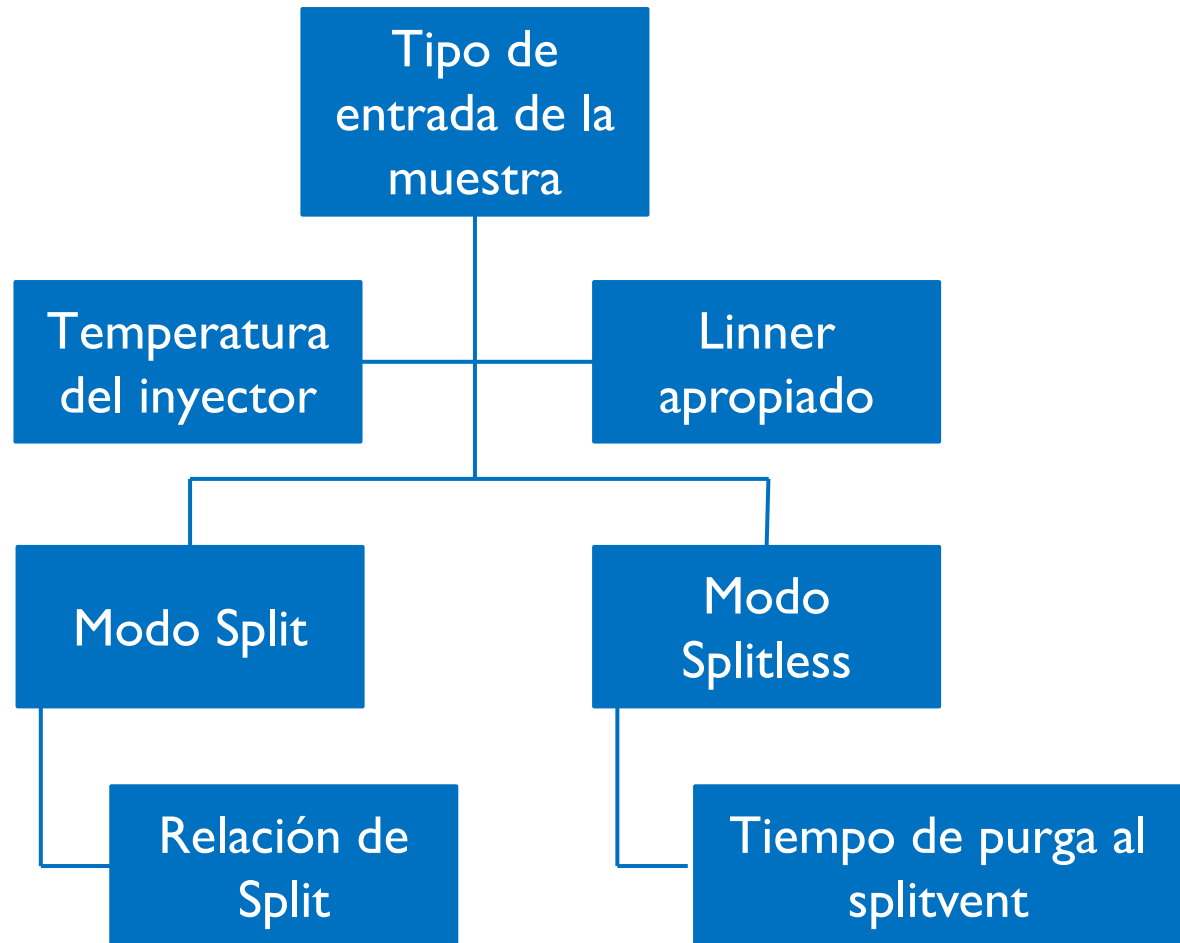
Inyector

- Split/Splitless
- Multimodo (MMI)
- On-column
- PTV (Vaporizador de temperatura programada)



Inyector

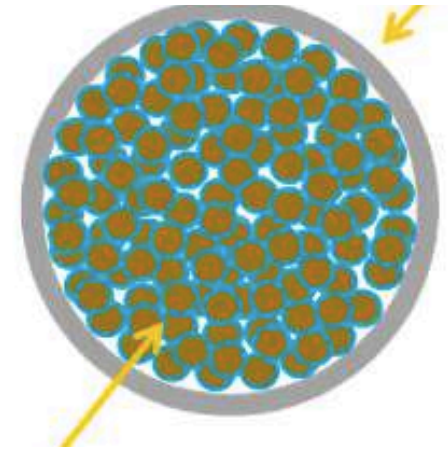
- Split/Splitless
- Multimodo (MMI)
- On-column
- PTV (Vaporizador de temperatura programada)



Tipo de columna:

Características principales de una columna:

- **Fase estacionaria:**
composición química y espesor de la película
- Naturaleza de la tubería
- Dimensiones: longitud, diámetro
- Tratamiento de desactivación

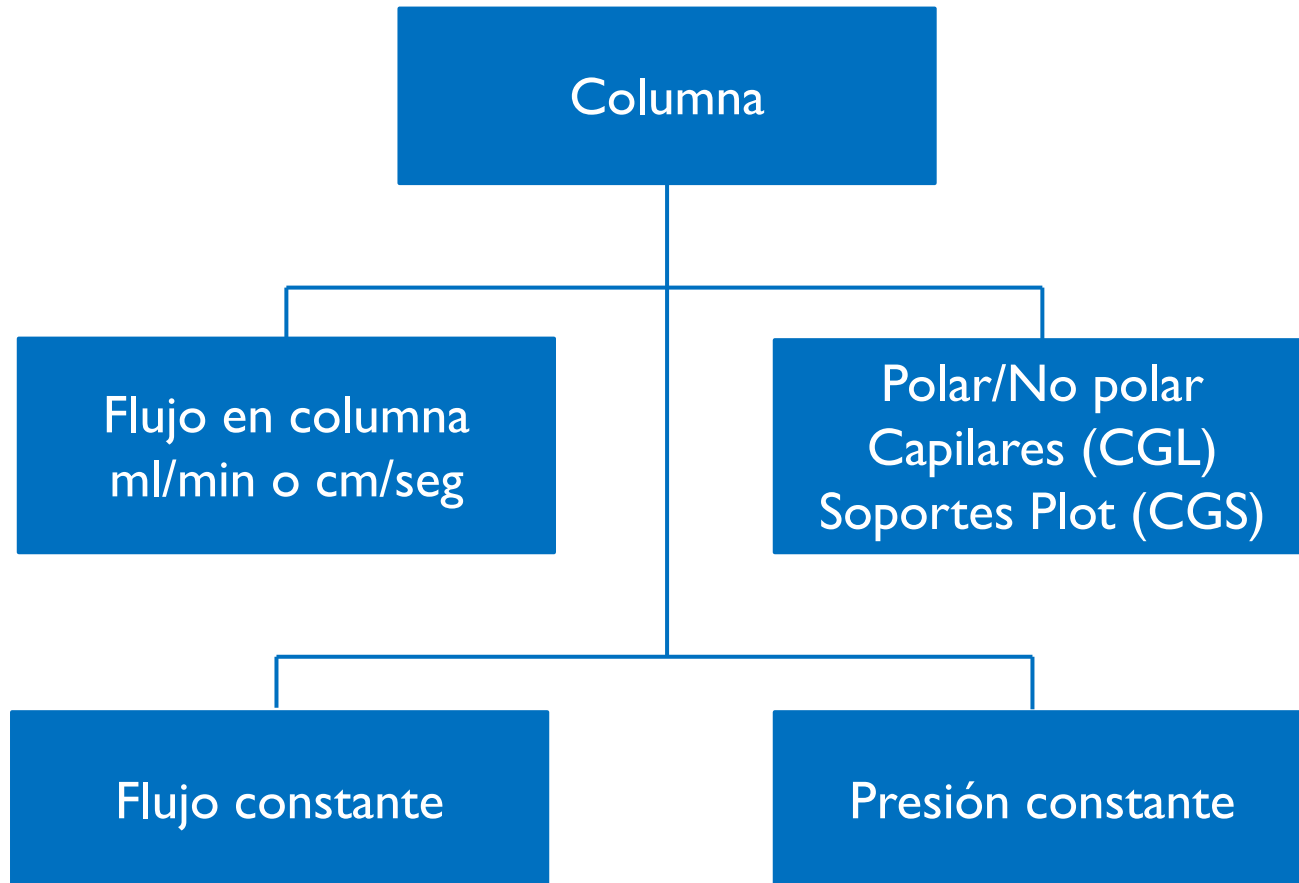


Columna empacada



Columna capilar

Tipo de columna:





RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe



Programación del horno:

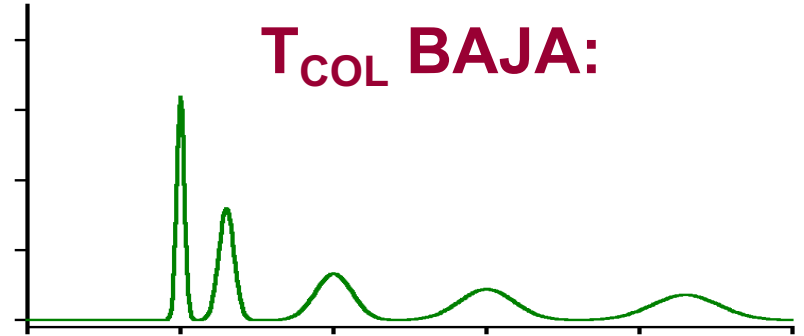
Programación
del horno

Siempre verificar
la temperatura
máxima de la
columna

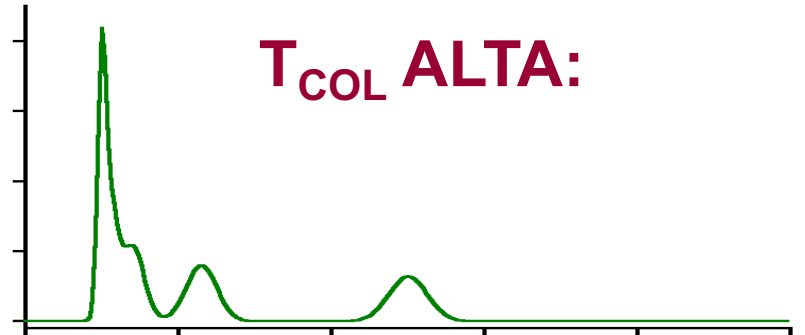
Isotérmico

Rampas de
Temperatura

T_{COL} BAJA:



T_{COL} ALTA:





RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe



Detectores comunes

Detector de conductividad
térmica

Detecta los compuestos que tiene una conductividad térmica diferente a la del gas portador.

Detector de ionización de
llama

Detecta los compuestos que sufren combustión o se ionizan al entrar en contacto con una llama.

Detector de captura de
electrones

Detecta los compuestos capaces de capturar electrones (por ejemplo, los compuestos halogenados)

Detector de nitrógeno-fósforo

Detecta los compuestos que contienen nitrógeno y fósforo.

Detector fotométrico de llama

Detecta los compuestos que contienen azufre y fósforo.

Detector de emisión atómica

Puede ajustarse para detectar numerosos elementos.

Detector selectivo de masas

Identifica componentes del espectro de masas.

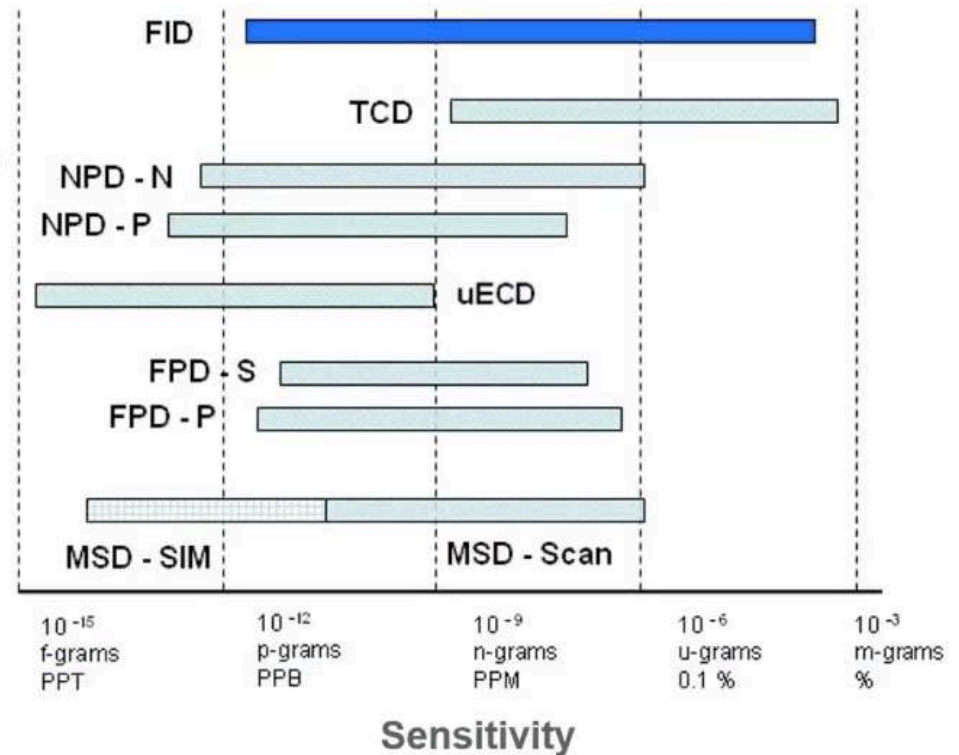
Detectores Destructivos y No-Destructivos

Destructivos

- FID- Ionización de llama
- NPD- Nitrógeno-Fósforo
- FPD- Fotométrico de llama
- MSD- Espectrométrico de masas

No Destructivos

- TCD
- ECD



Espectrometría de masa

La espectrometría de masa (MS) es una técnica analítica, que permite identificar la cantidad y tipo de compuestos químicos presentes en una muestra, midiendo la relación masa/carga y la abundancia de los iones en fase gaseosa.

Un espectro de masas es un gráfico de la señal del ion en función de la relación masa/carga. A partir de los espectros, se utilizan la masa de ion molecular y los fragmentos para determinar la composición elemental. Esta información se utiliza para determinar las estructuras químicas de las moléculas que puedan separarse por CG, como los plaguicidas.

La espectrometría de masa funciona ionizando los compuestos químicos para generar moléculas cargadas o fragmentos de moléculas y medir su relación masa/carga.

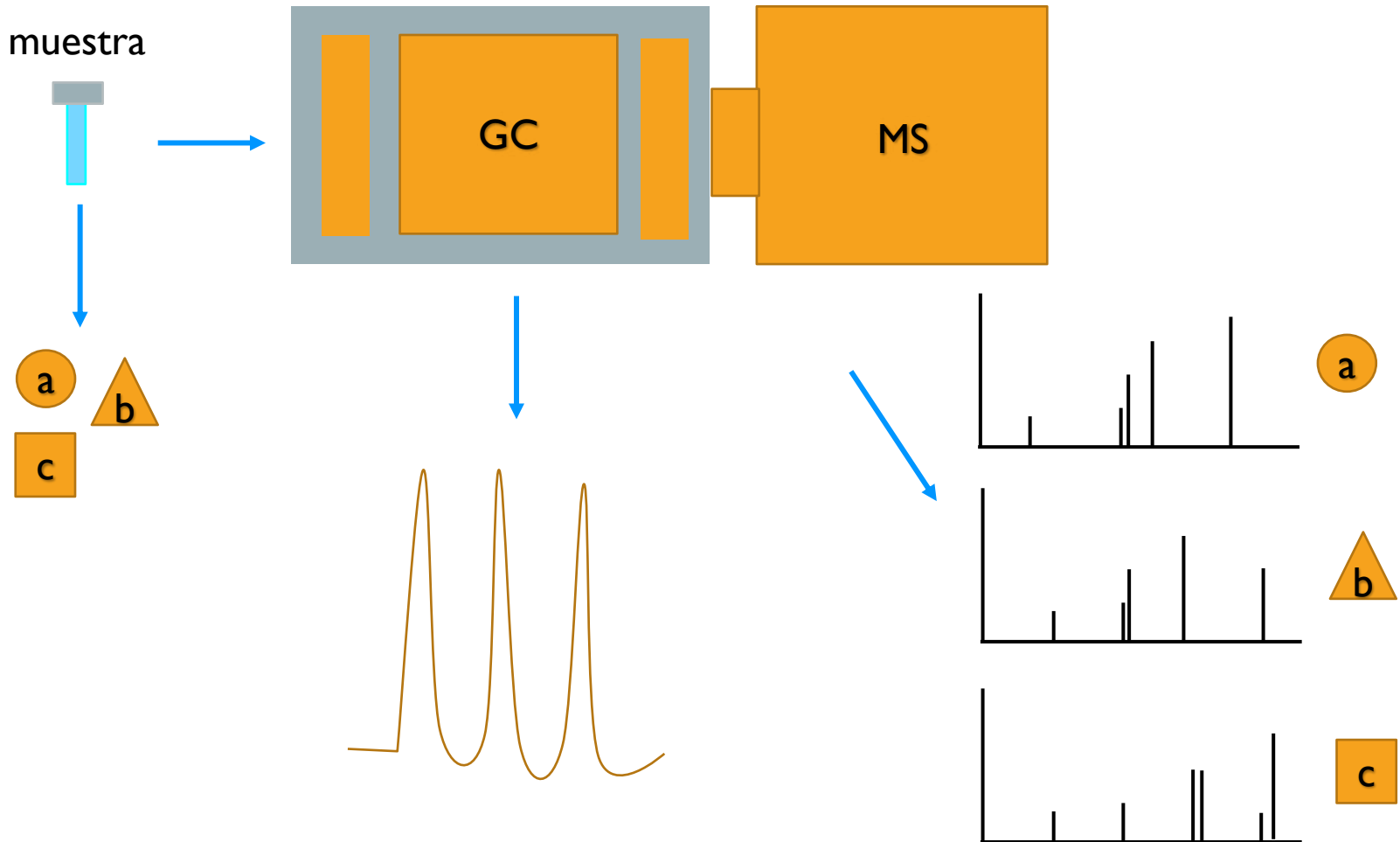


RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe

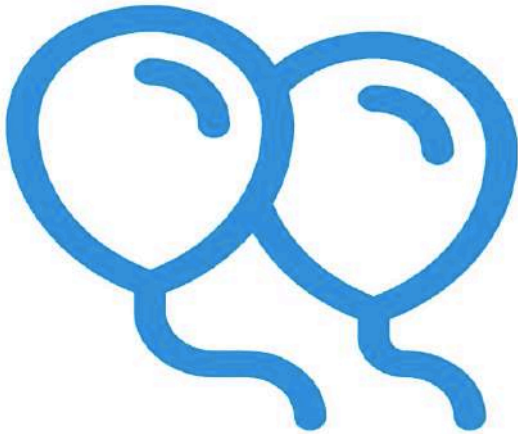


Acoplamiento GC-MS

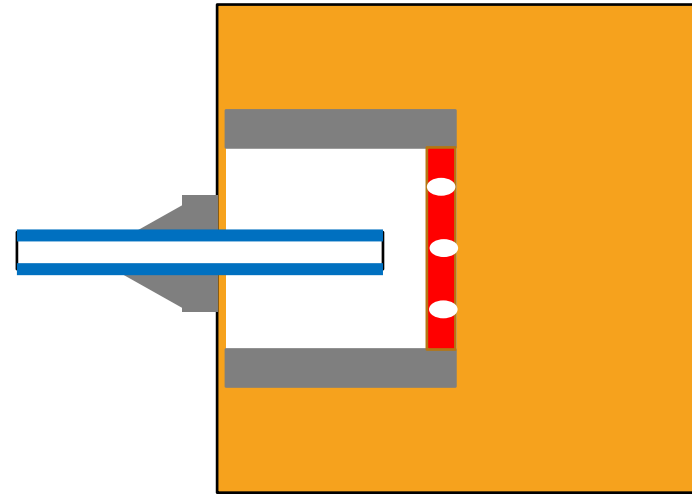


Acoplamiento GC-MS

Si limitamos la CG a columnas capilares, los sistemas MS actuales pueden usar todo el efluente de la columna

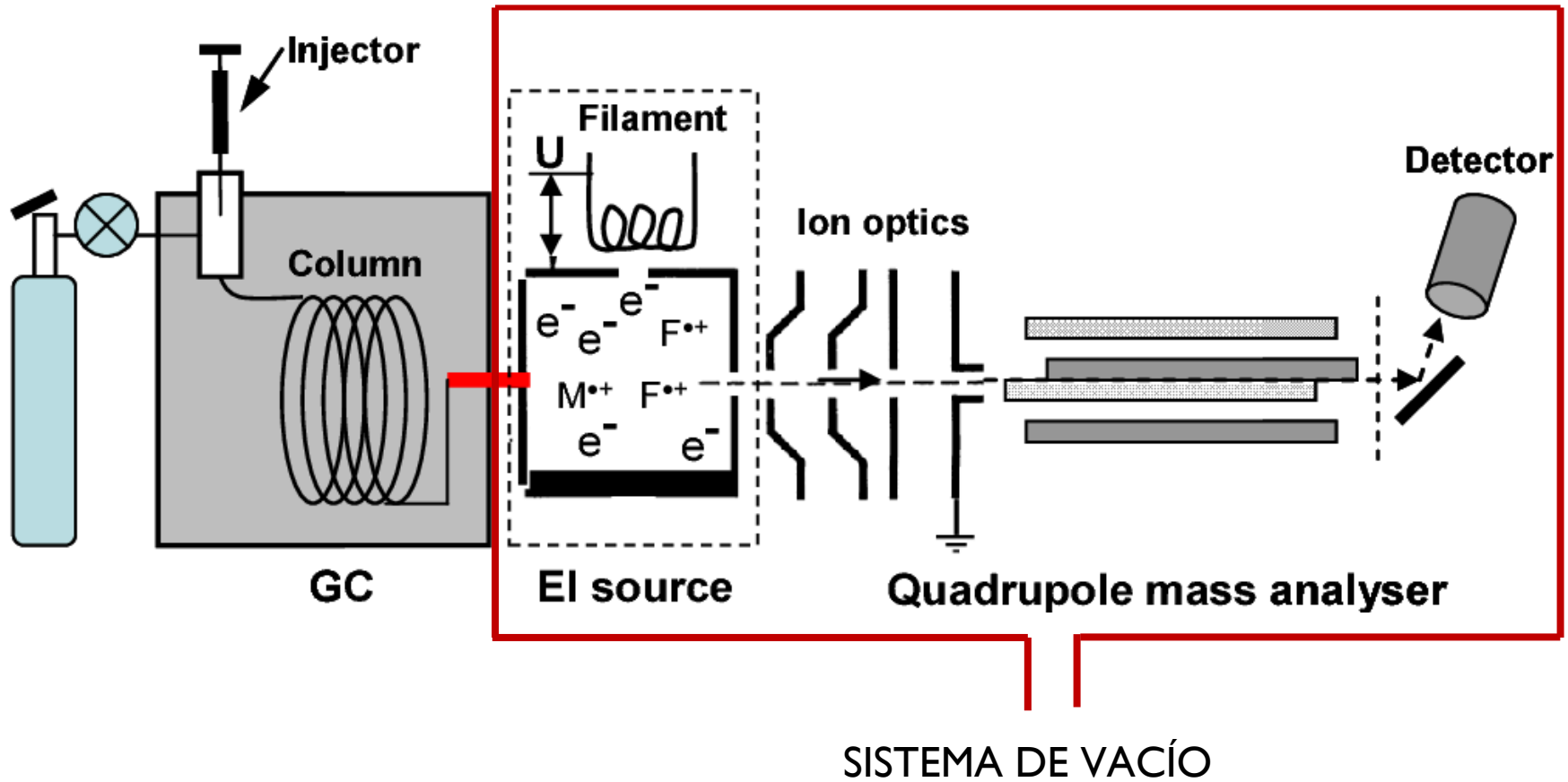


columna



FUENTE DE IONIZACIÓN

Espectrómetro de masas



Espectrómetro de masas: Fuente de ionización

**COMPUESTOS
VOLÁTILES**

IMPACTO ELECTRÓNICO (EI)

IONIZACIÓN QUÍMICA (CI)

**COMPUESTOS
NO VOLÁTILES**

DESORCIÓN POR CAMPO (FD)

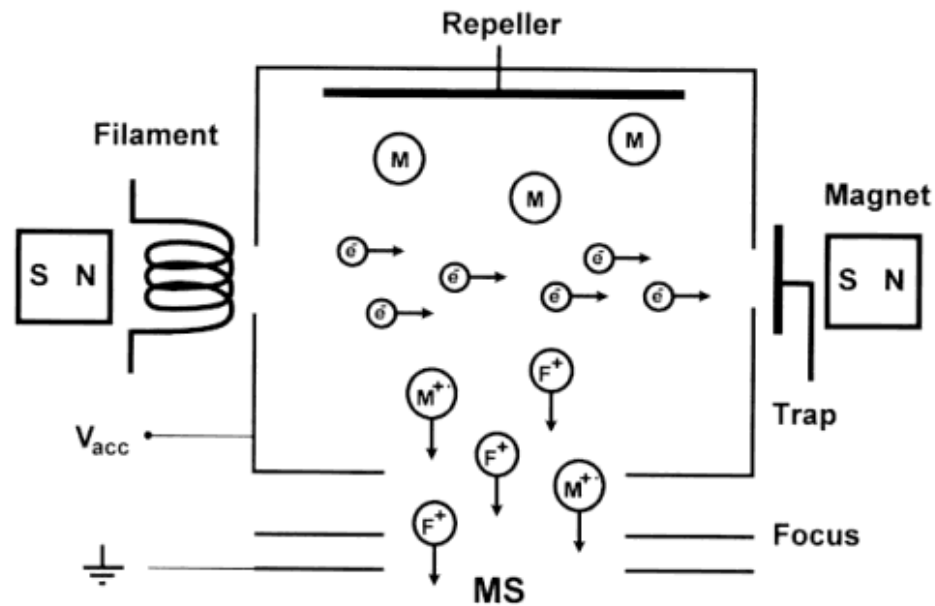
BOMBARDEO CON ÁTOMOS RÁPIDOS (FAB)

SECONDARY ION MASS SPECTROMETRY (SIMS)

DESORCIÓN POR PLASMA (PD)

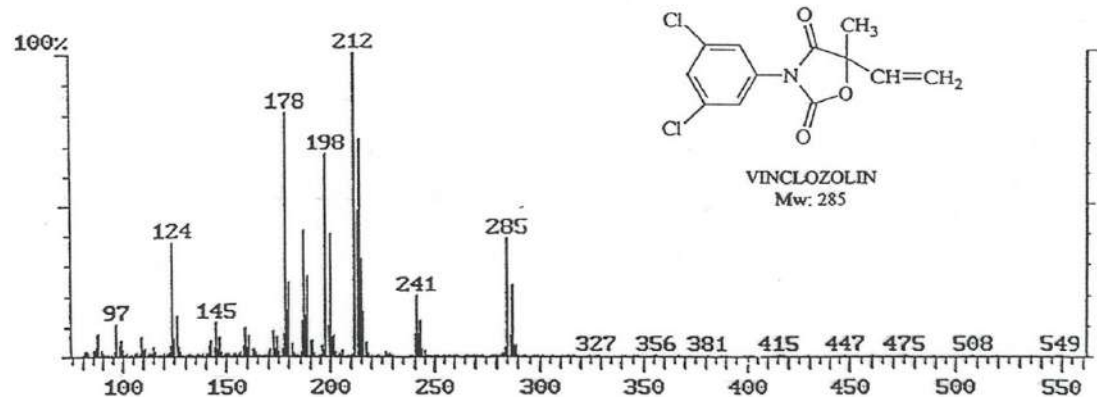
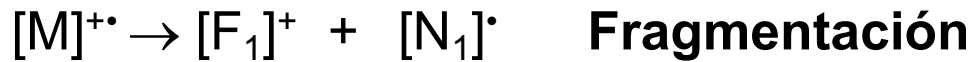
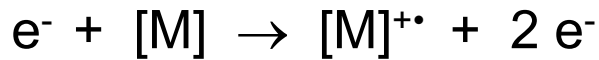
ELECTROSPRAY (ESI)

Fuente de ionización: Impacto electrónico



Schematic representation of an electron ionization ion source. M represents neutral molecules; e^- , electrons; M^+ , the molecular ion; F^+ , fragment ions; V_{acc} , accelerating voltage; and MS, the mass spectrometer analyzer.

Fuente de ionización: Impacto electrónico



Fuente de ionización: Impacto electrónico

VENTAJAS

Método reproducible
Abundante fragmentación
Eficiencia de ionización alta
Ionización no selectiva

Identificación por bibliotecas de espectros
Abundante información estructural
Método sensible
Todas las moléculas vaporizadas pueden ionizarse

DESVENTAJAS

Solo iones positivos
Sólo muestras volátiles
Ionización no selectiva
Elevada energía

No ideal para algunas clases de compuestos
Limitada a compuestos de bajo peso molecular (<600 Da)
Todas las moléculas vaporizadas contribuyen al espectro de masas
Posible ausencia del ion molecular

Fuente de ionización:

Ionización química

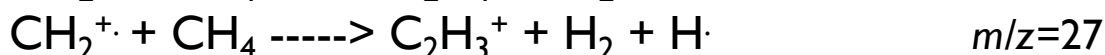
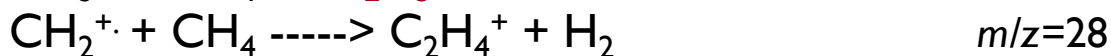
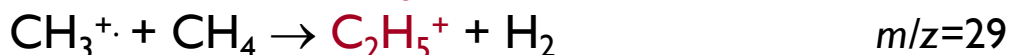
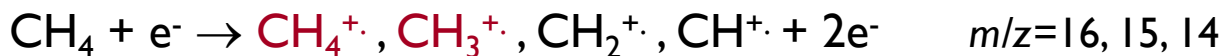
- Un gas reactivo (metano, amoniaco, isobutano, acetonitrilo) es introducido en la fuente iónica de forma controlada.
- El gas reactivo es bombardeado con electrones (150-200eV) generándose una serie de especies nuevas (iones y electrones de baja energía).
- Las condiciones de la fuente (presión, temperatura y energía electrónica) controlan el tipo y proporción de las nuevas especies generadas.
- Las moléculas de la muestra interaccionan con los iones del gas reactivo y se ionizan.
- El sistema puede estar configurado para detectar iones positivos (PCI) o iones negativos (NCI).

Fuente de ionización: Ionización química positiva (PCI)

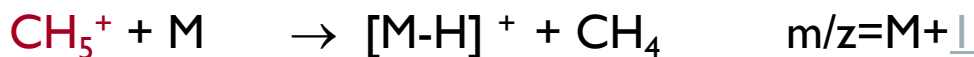
- Gas (ej. CH₄) en la fuente de ionización
- Producción de dador de protones
 - $\text{CH}_4 + e^- \rightarrow \text{CH}_4^+ + 2e^-$
 - $\text{CH}_4^+ + \text{CH}_4 \rightarrow \text{CH}_5^+ + \text{CH}_3$
- Dador de protones reacciona con los analitos y produce:
 - MH⁺ (información molecular)
 - Poca o nula fragmentación

Fuente de ionización: Ionización química positiva (PCI)

FORMACION DE IONES DEL GAS REACTIVO:

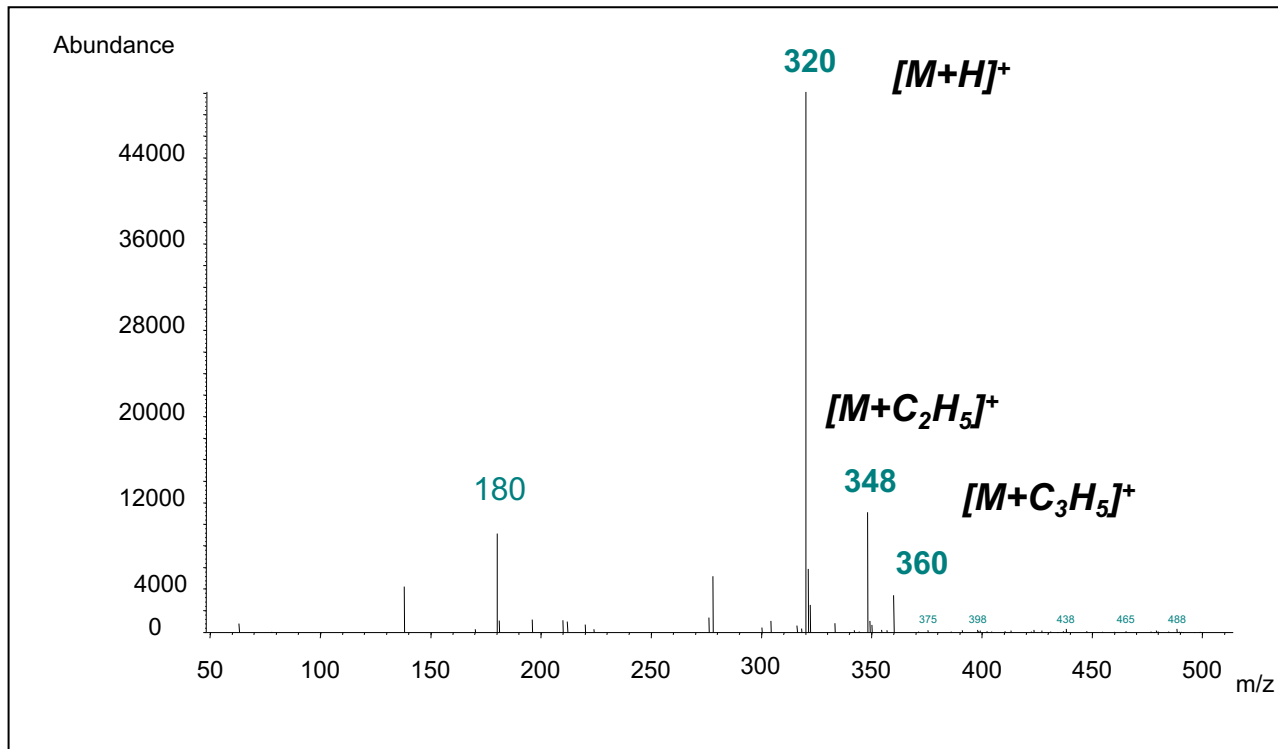


FORMACION DE IONES DE LA MUESTRA:



Fuente de ionización: Ionización química positiva (PCI)

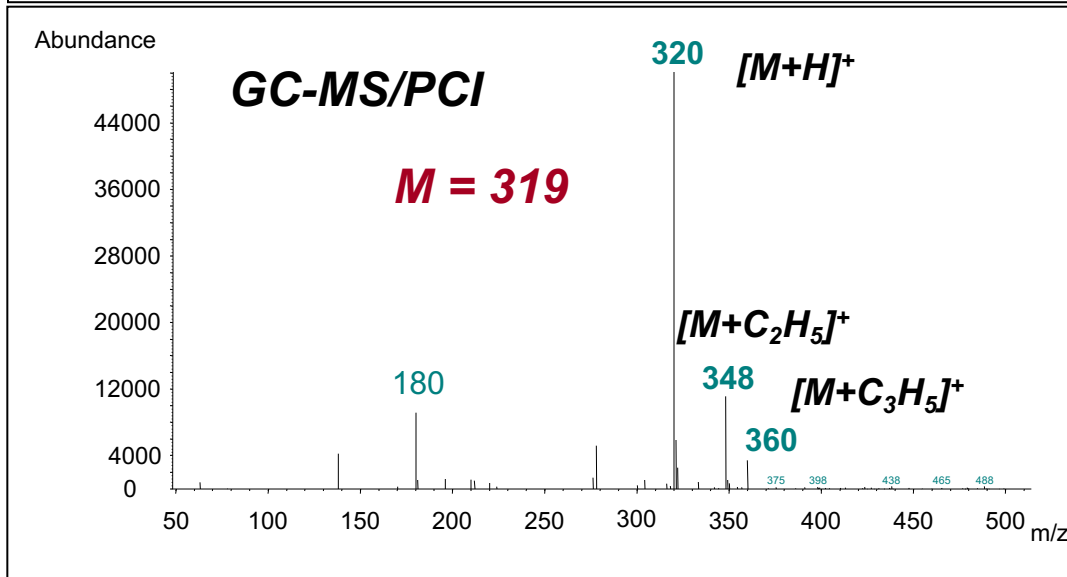
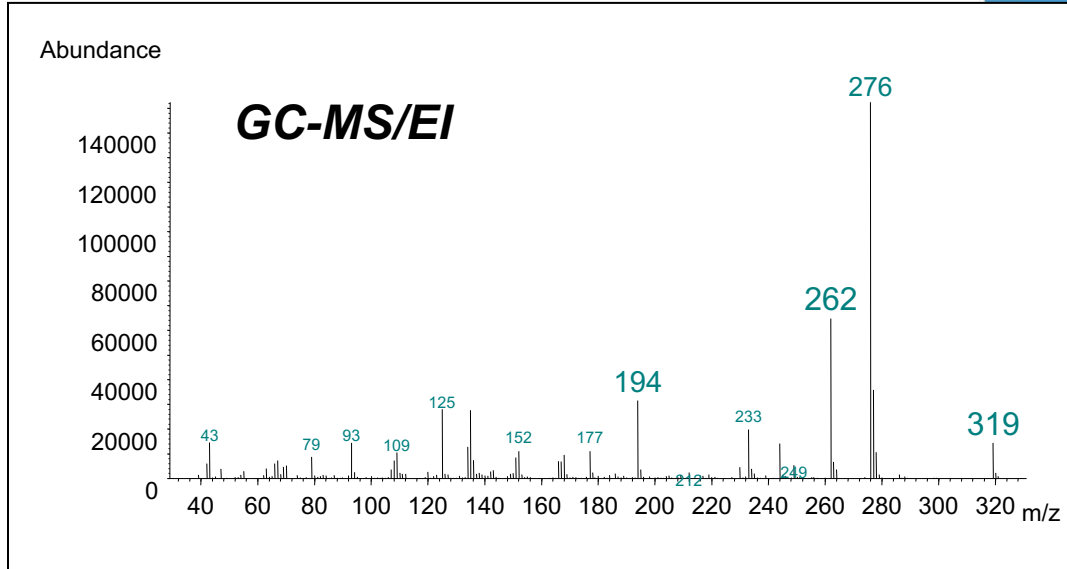
Pirimetanol- PCI (CH₄)





RALACA

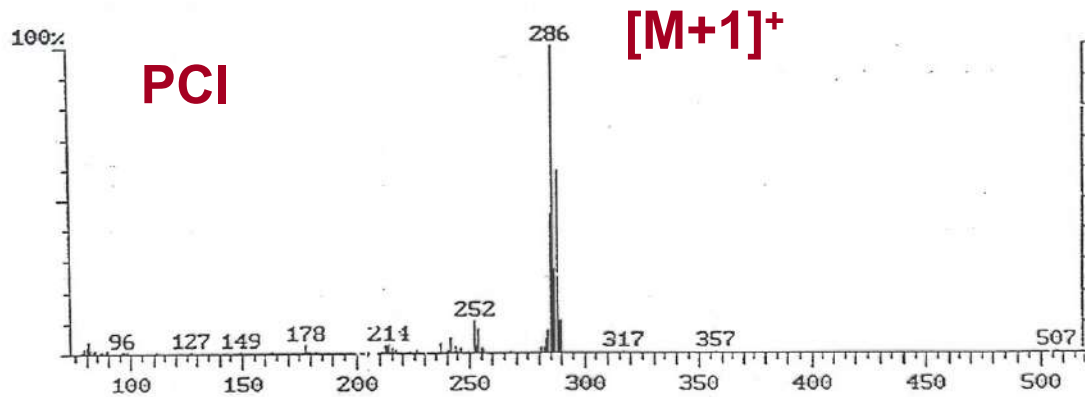
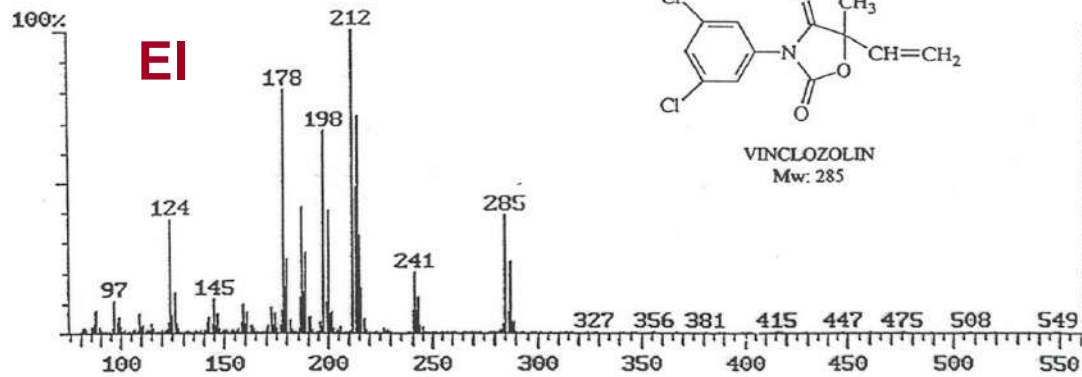
Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe





RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe

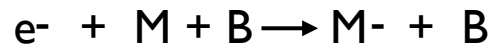


Fuente de ionización: Ionización química negativa (NCI)

Los procesos por los cuales se pueden generar iones negativos son:

Compuestos con dobles enlaces conjugados o heteroátomos capaces de capturar electrones

Captura Electrónica



Amortiguador o gas moderador. Actúa absorbiendo el exceso de energía

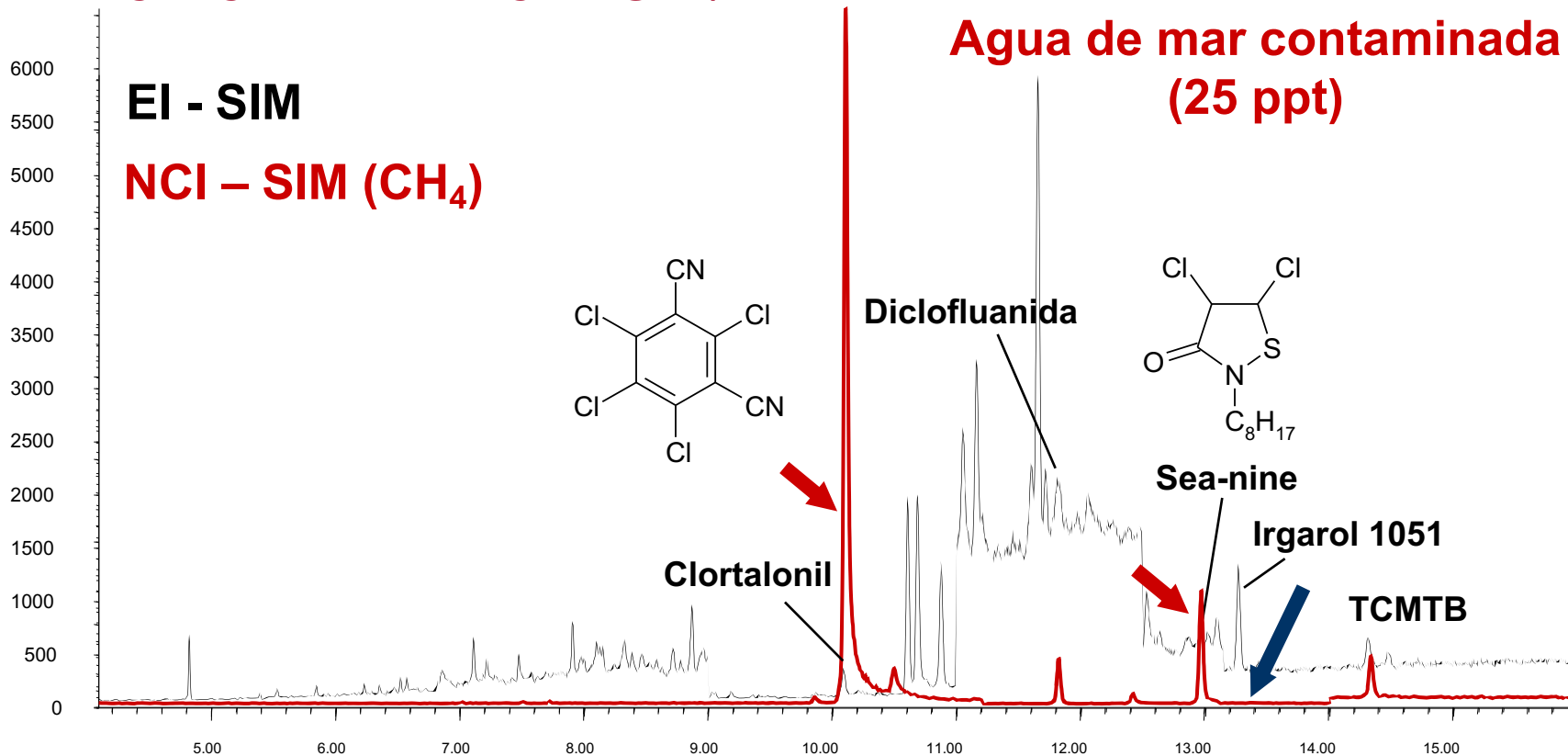
Ionización química mediante iones reactivos



La energía que se genera se fija normalmente en la molécula B del gas moderador, o en el enlace R-H de la especie neutra formada, por lo que suele originarse muy poca fragmentación en este tipo de procesos.

Fuente de ionización: Ionización química negativa (NCI)

SENSIBILIDAD Y SELECTIVIDAD



Fuente de ionización: Ionización química

VENTAJAS

Ionización “blanda”	Presencia de ion molecular (PCI)	} Confirmación identidad
Formación de aductos	(e.g. at $M+17$, $M+29$ o $M+41$ para CH_4)	
Menor fragmentación	Señales más intensas: Mayor sensibilidad	
Ionización selectiva	La selección del gas reactivo determina la selectividad	
Uso de metano	Ioniza casi cualquier molécula	
Especificidad	NCI da métodos muy selectivos sin interferencias de matriz	

DESVENTAJAS

Menor fragmentación	Escasa información estructural
Ionización selectiva	No todas las moléculas ionizan (NCI)

Fuente de ionización:

¿Cuándo usar CI?

Sensibilidad (según compuestos)
Selectividad (muestras complejas)
Confirmación de pesos moleculares

¿Qué gas reactivo utilizar?

Metano
Amoniaco
Isobutano
Acetonitrilo

¿Qué parámetros afectan la CI?

T^a de la fuente
Presión de gas reactivo
Energía de los electrones

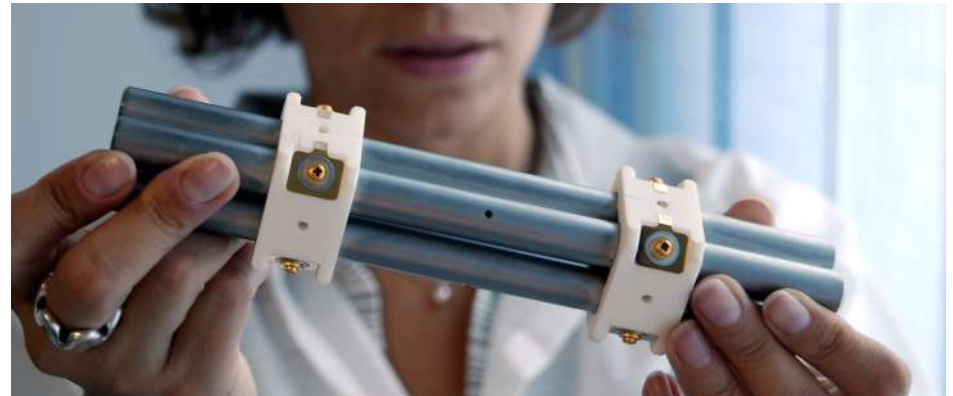
Analizadores

Son la parte esencial del EM de la que dependen:

- Sensibilidad
- Rango de masas
- Resolución de masas (capacidad para medir masas exactas)

TIPOS

- Analizadores magnéticos
- Analizadores cuadrupolares
- Analizadores de tiempo de vuelo
- Trampa de iones
- Orbitrap

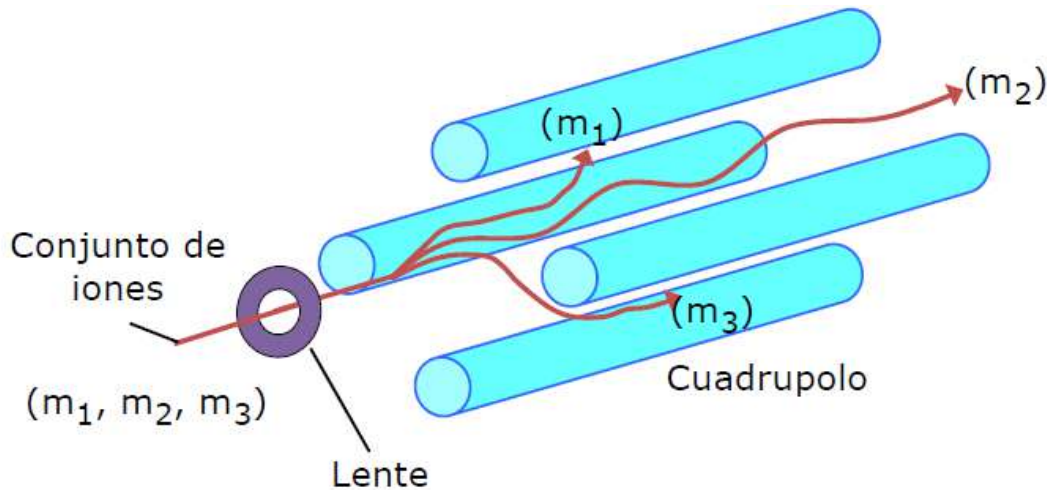
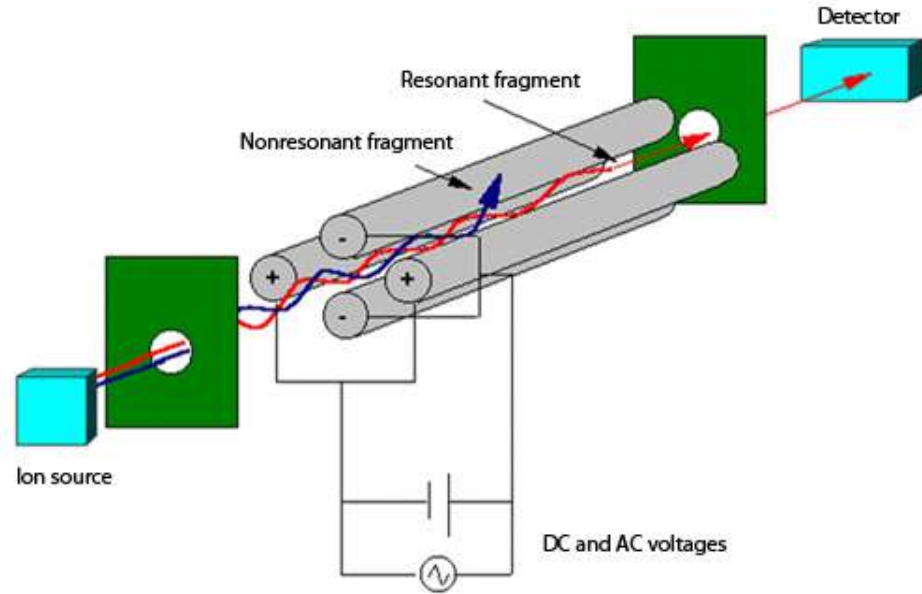




RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe

Analizadores: Cuadripolo (Q)



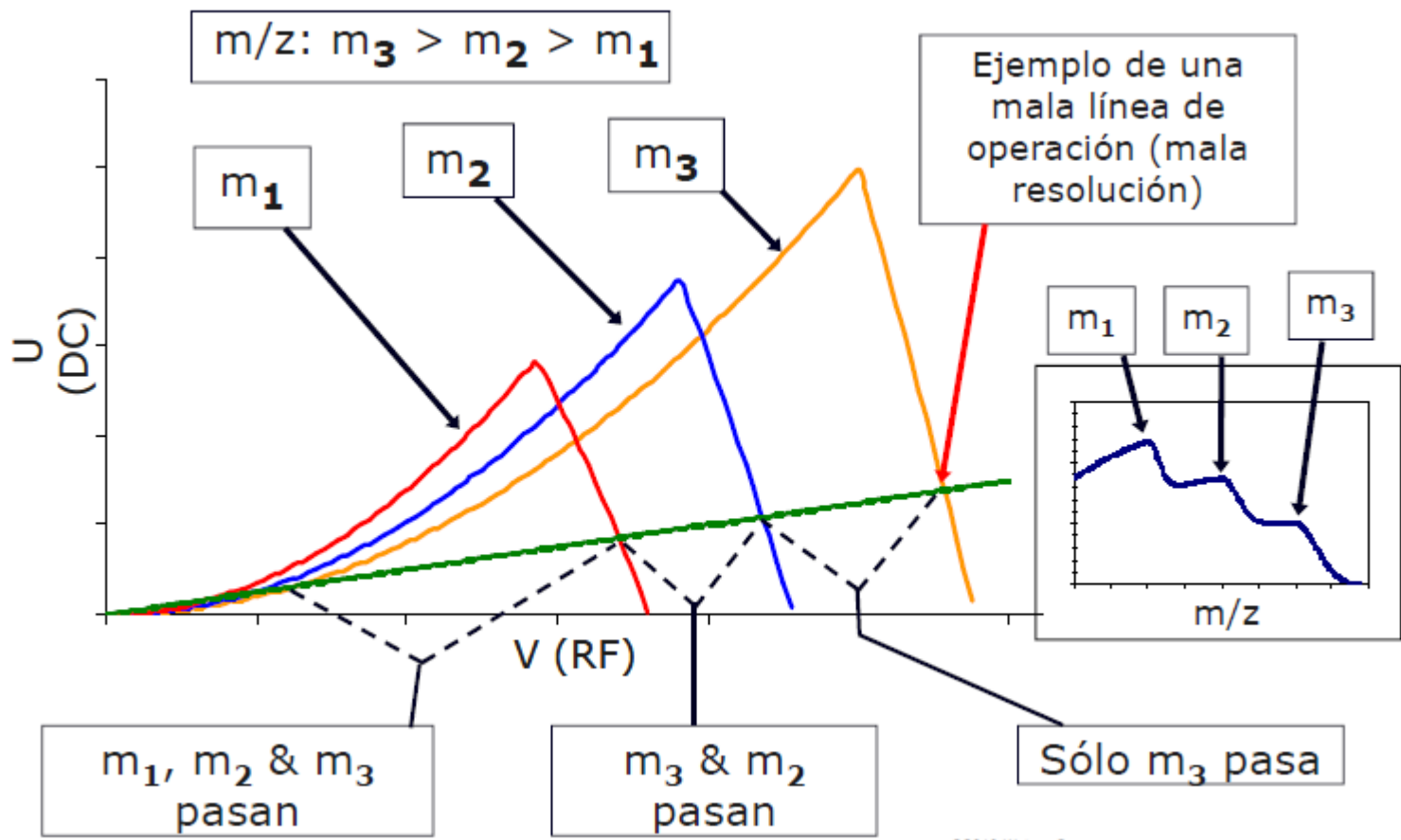


RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe



Analizadores: Cuadrupolo (Q)



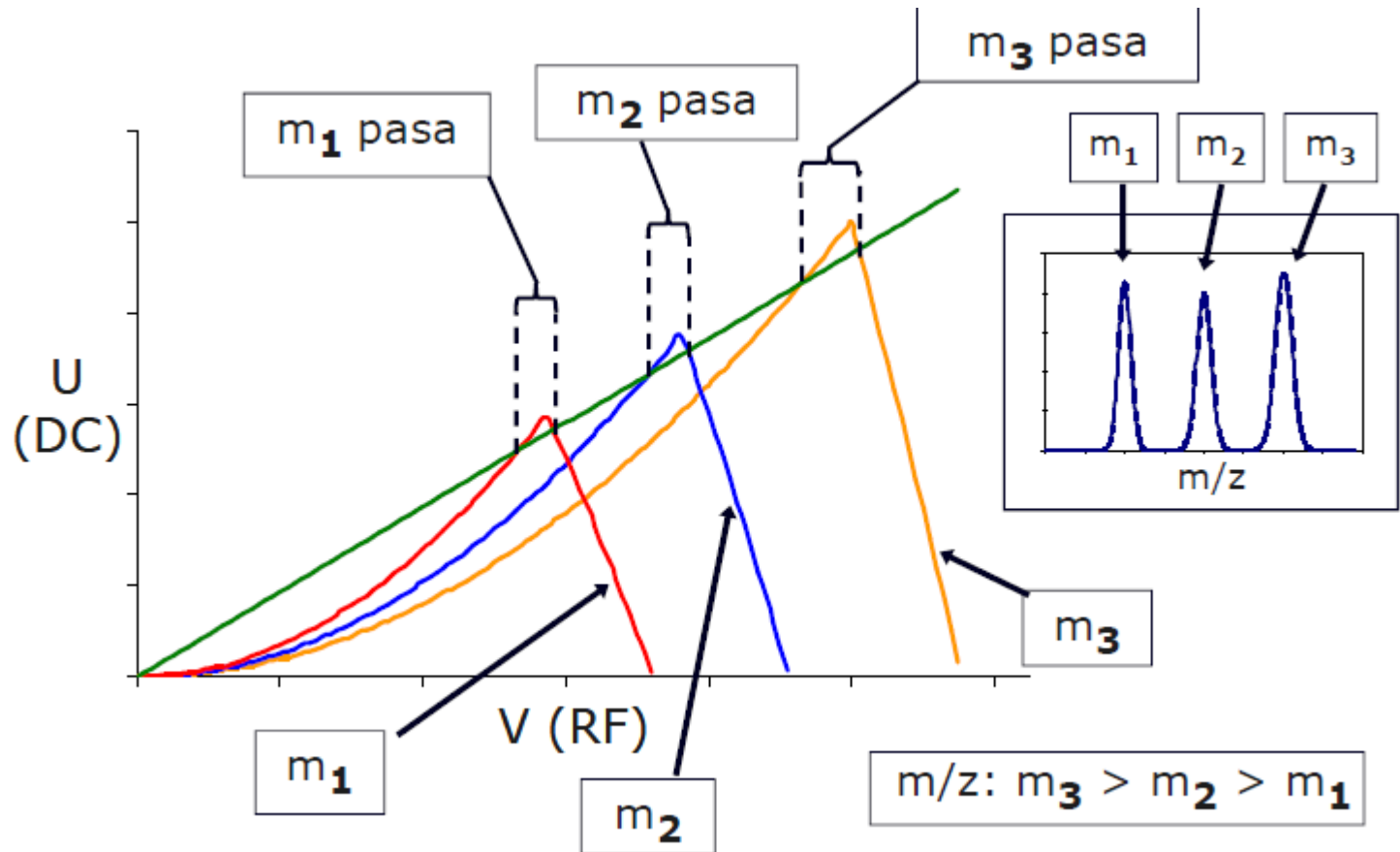


RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe



Analizadores: Cuadrupolo (Q)



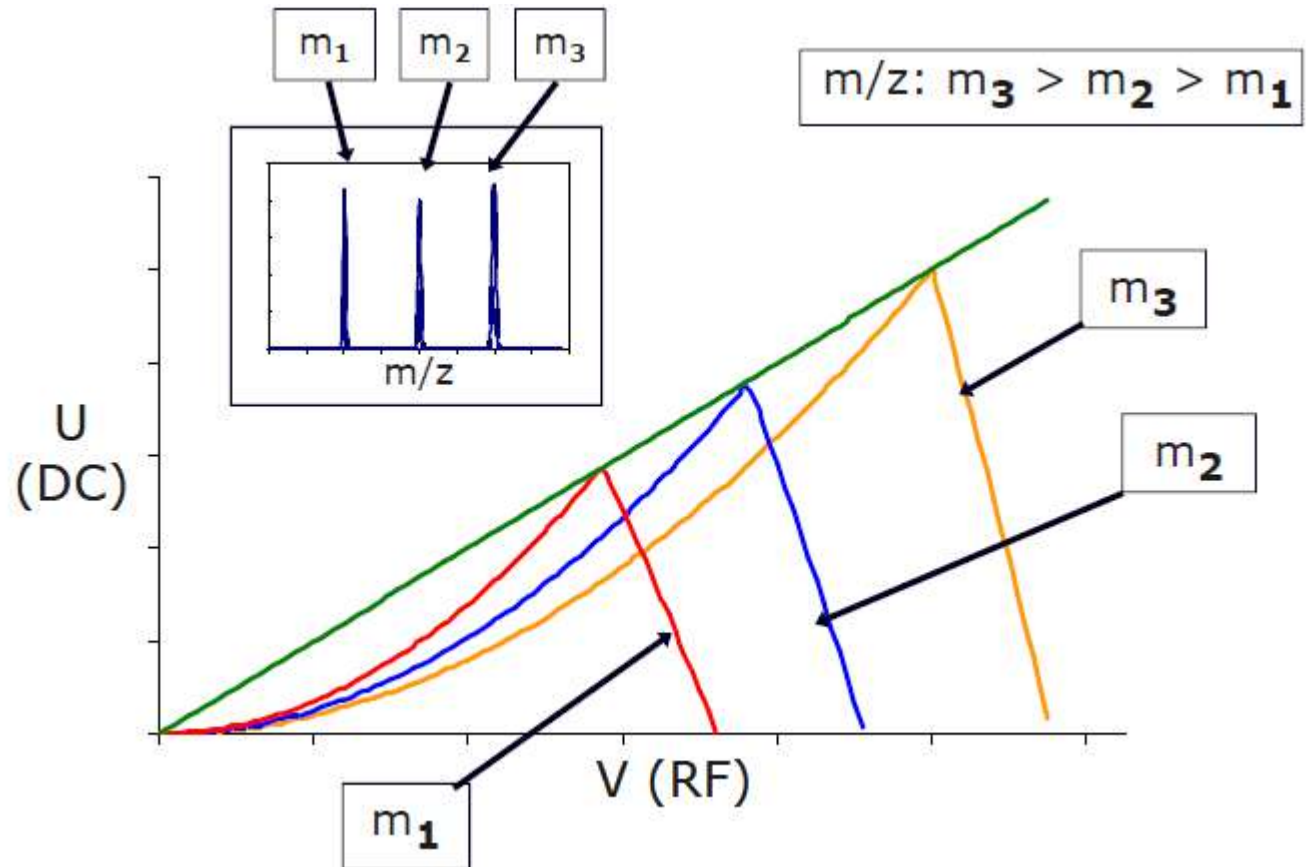


RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe

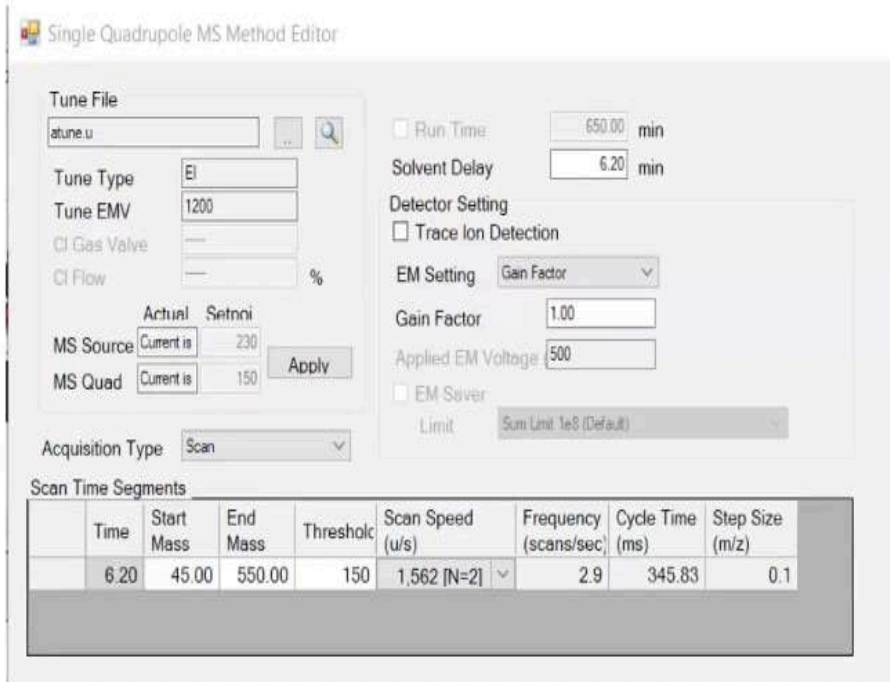


Analizadores: Cuadripolo (Q)



Espectro de masas

SCAN



Single Quadrupole MS Method Editor

Tune File: atune.u

Tune Type: EI

Tune EMV: 1200

CI Gas Valve: []

CI Flow: [] %

MS Source: Current is 230

MS Quad: Current is 150

Acquisition Type: Scan

Run Time: 650.00 min

Solvent Delay: 6.20 min

Detector Setting: [] Trace Ion Detection

EM Setting: Gain Factor

Gain Factor: 1.00

Applied EM Voltage: 500

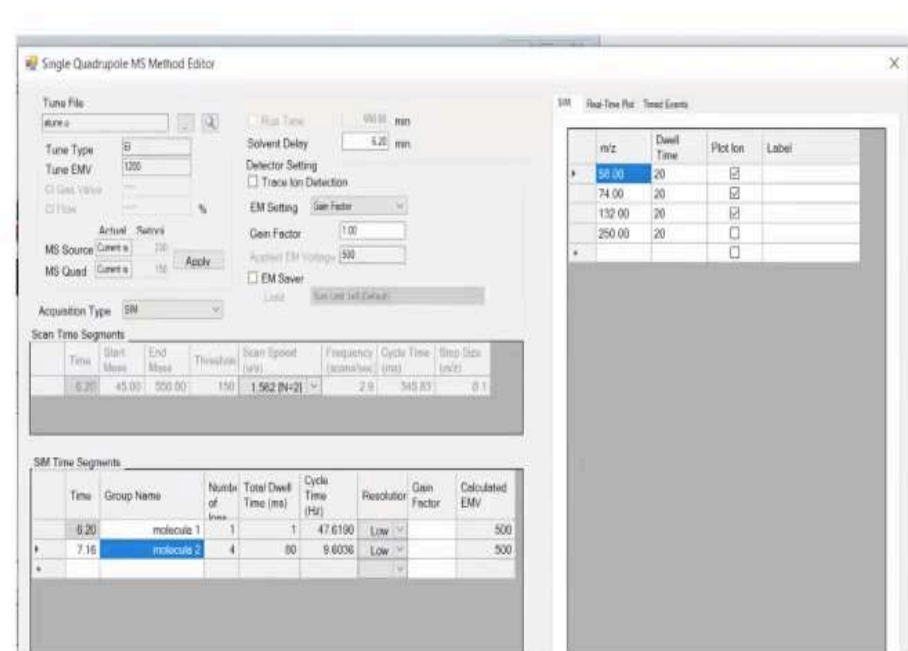
EM Saver: []

Limit: Sum Limit 1e8 (Default)

Time	Start Mass	End Mass	Threshold	Scan Speed (u/s)	Frequency (scans/sec)	Cycle Time (ms)	Step Size (m/z)
6.20	45.00	550.00	150	1,562 [N=2]	2.9	345.83	0.1

El espectrómetro es examinado en todo el rango de masas (50-600 u). Se obtienen espectros de masas completos.

SIM



Single Quadrupole MS Method Editor

Tune File: []

Tune Type: []

Tune EMV: 1200

CI Gas Valve: []

CI Flow: [] %

MS Source: Current is 230

MS Quad: Current is 150

Acquisition Type: SIM

Run Time: 650.00 min

Solvent Delay: 6.20 min

Detector Setting: [] Trace Ion Detection

EM Setting: Gain Factor

Gain Factor: 1.00

Applied EM Voltage: 500

EM Saver: []

Limit: Sum Limit 1e8 (Default)

Time	Group Name	Number of Ions	Total Dwell Time (ms)	Cycle Time (Hz)	Resolution	Gain Factor	Calculated EMV
6.20	molecule 1	1	1	47.6100	Low		500
7.16	molecule 2	4	80	6.6036	Low		500

m/z	Dwell Time	Plot Ion	Label
50.00	20	[]	
74.00	20	[]	
132.00	20	[]	
250.00	20	[]	

Se examina uno o un número limitado de iones durante un intervalo dado del cromatograma.

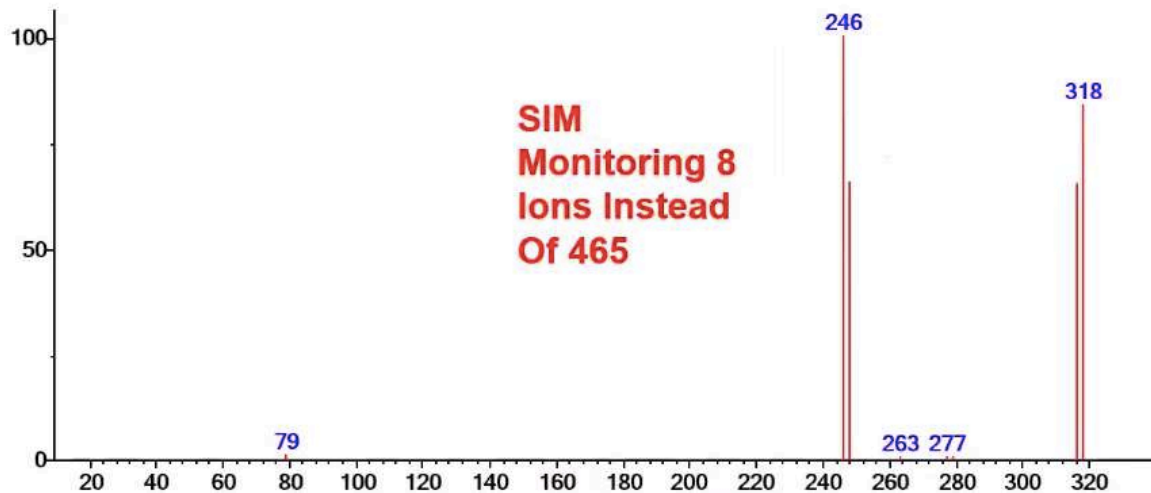
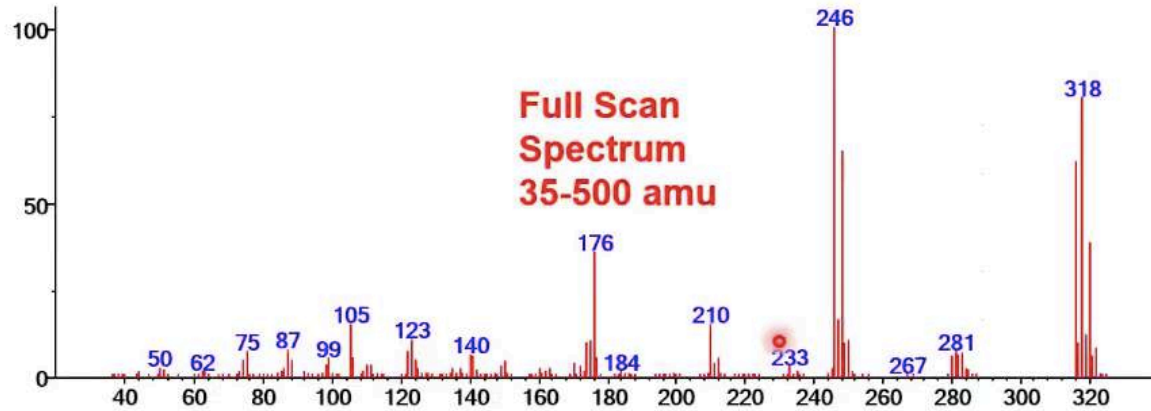


RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe



Espectro de masas





RALACA

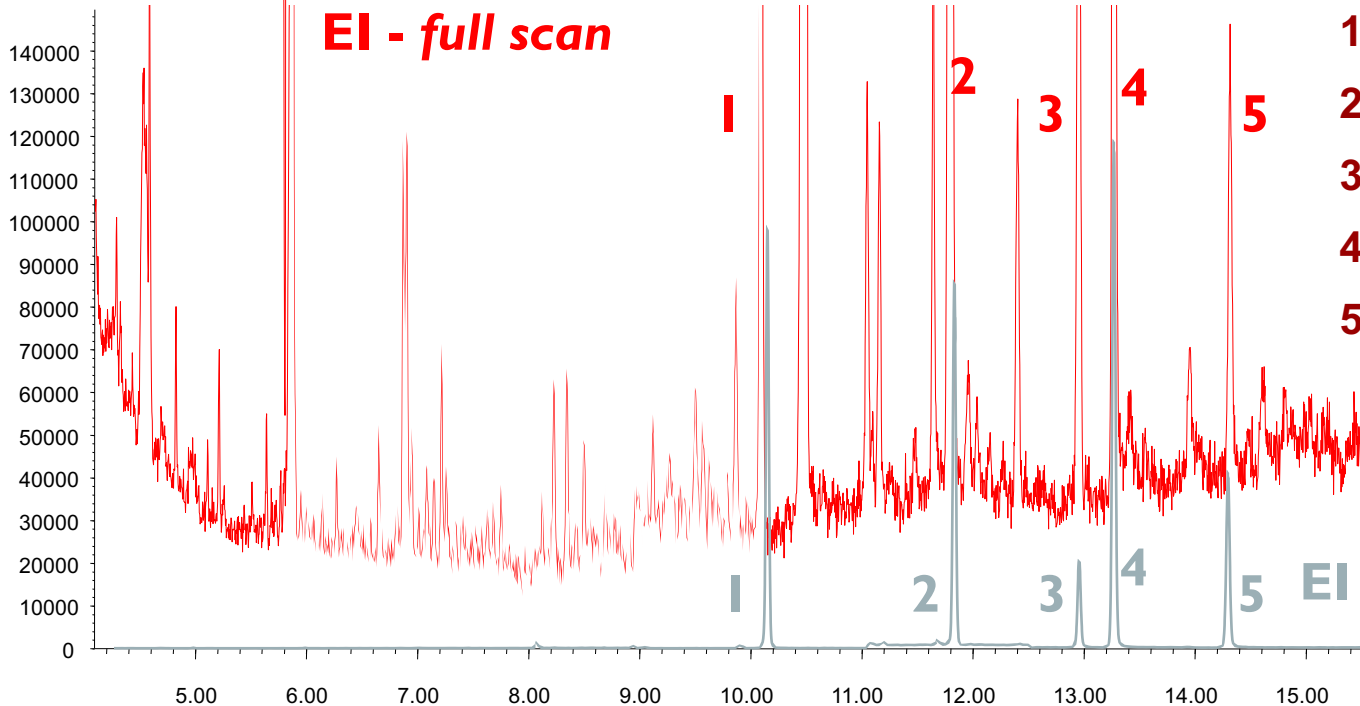
Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe



Extracto de agua de mar contaminado 150 $\mu\text{g/l}$

Abundancia

EI - full scan

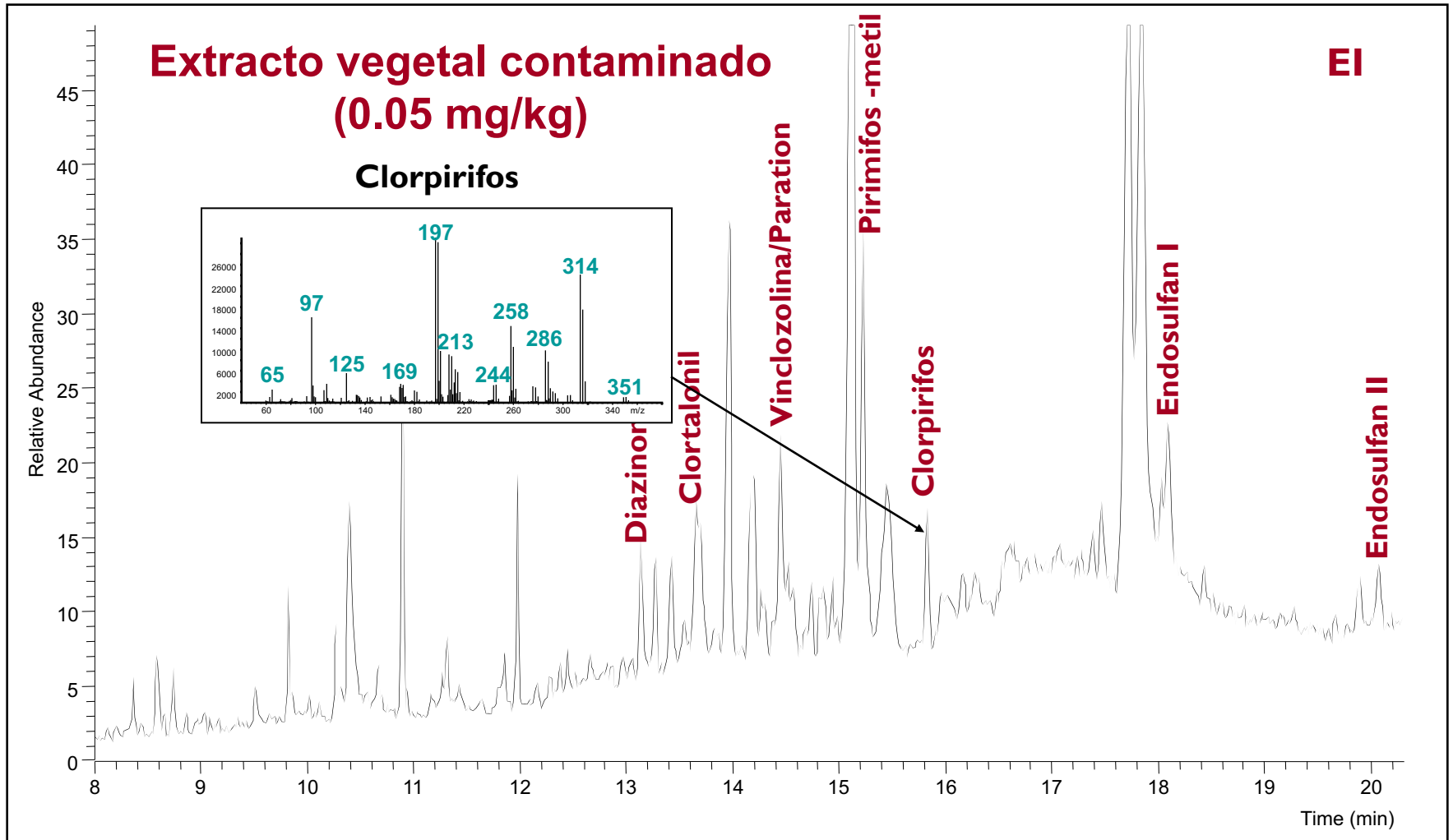


- 1- Clortalonil**
- 2- Diclofluanida**
- 3- Sea-nine**
- 4- Irgarol 1051**
- 5- TCMTB**

Tiempo (min)

EI - SIM

GC-IT-MS





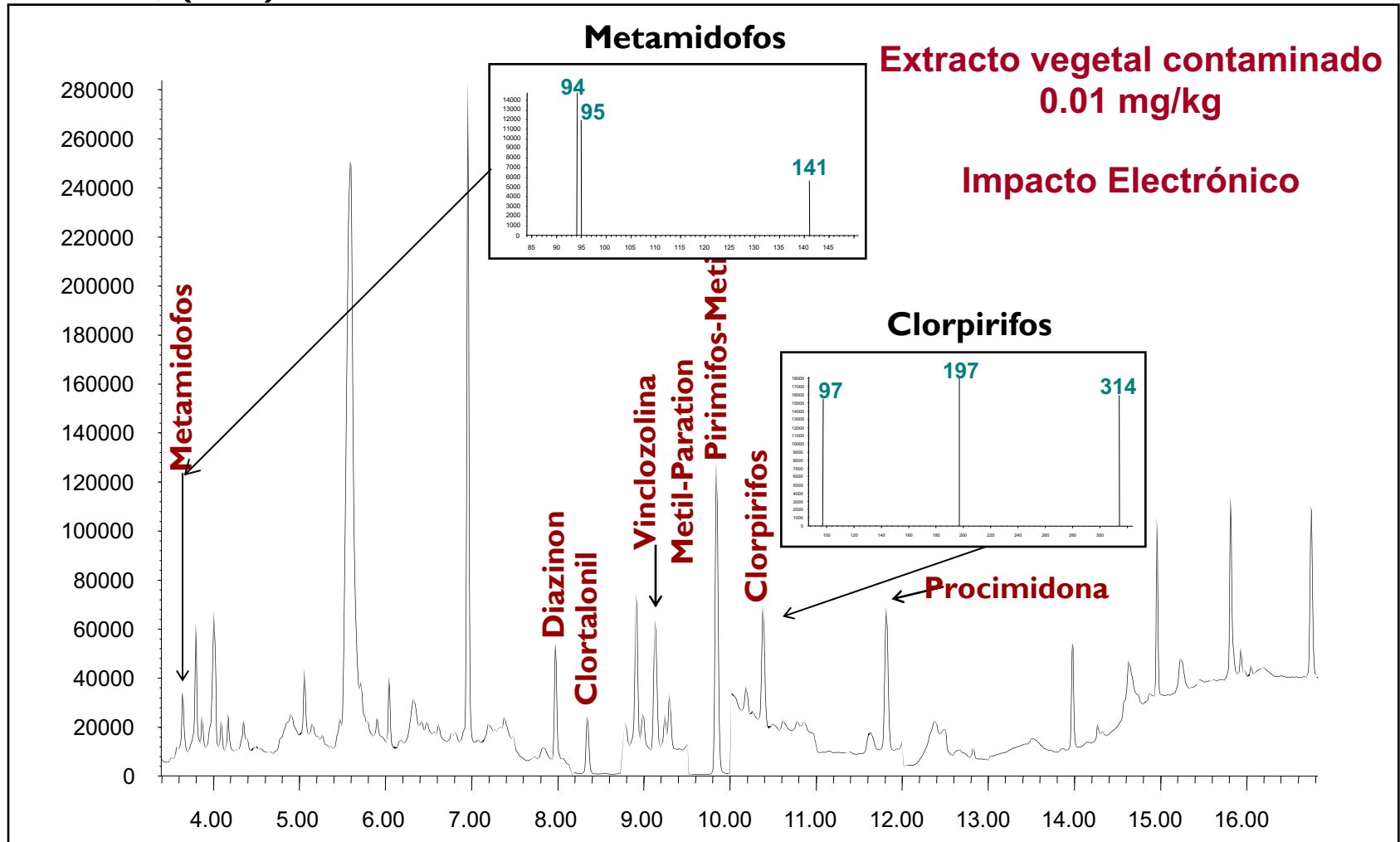
RALACA

Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe



ACADEMIA
RALACA
Red Analítica de Latinoamérica y el Caribe

GC-Q (SIM)



Espectro de masas: Modo SIM

SELECCIÓN DE IONES DIAGNÓSTICO

- IONES MÁS ABUNDANTES: MAYOR SENSIBILIDAD
- RELACIÓN m/z ALTA: MAYOR SELECTIVIDAD
- AUSENCIA EN EL RUIDO Y EN LA MATRIZ: BLANCOS
- COELUCIONES: IONES DIFERENTES PARA CADA COMPUESTO
- COMPUESTOS HALOGENADOS: IONES DEL “CLUSTER”

Modo “full scan”:

VENTAJAS:

- Elevada información estructural. Gran capacidad de identificación.
- Posibilidad de utilizar bibliotecas de espectros.

INCONVENIENTES:

- Menor sensibilidad (en cuadrupolo).

Modo SIM:

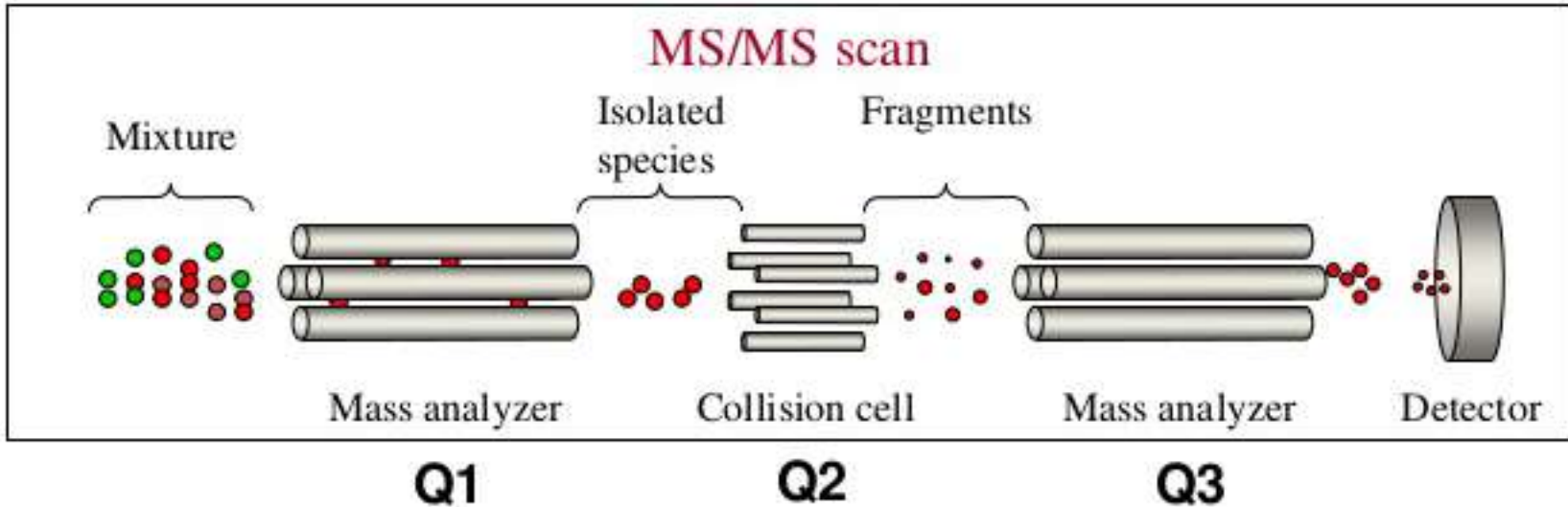
VENTAJAS:

- Elevada sensibilidad (hasta tres órdenes de magnitud en cuadrupolo).
- Mayor selectividad (elevada relación S/N).
- Buena cuantificación de analitos conocidos.
- Útil en análisis de compuestos poco resueltos.

INCONVENIENTES:

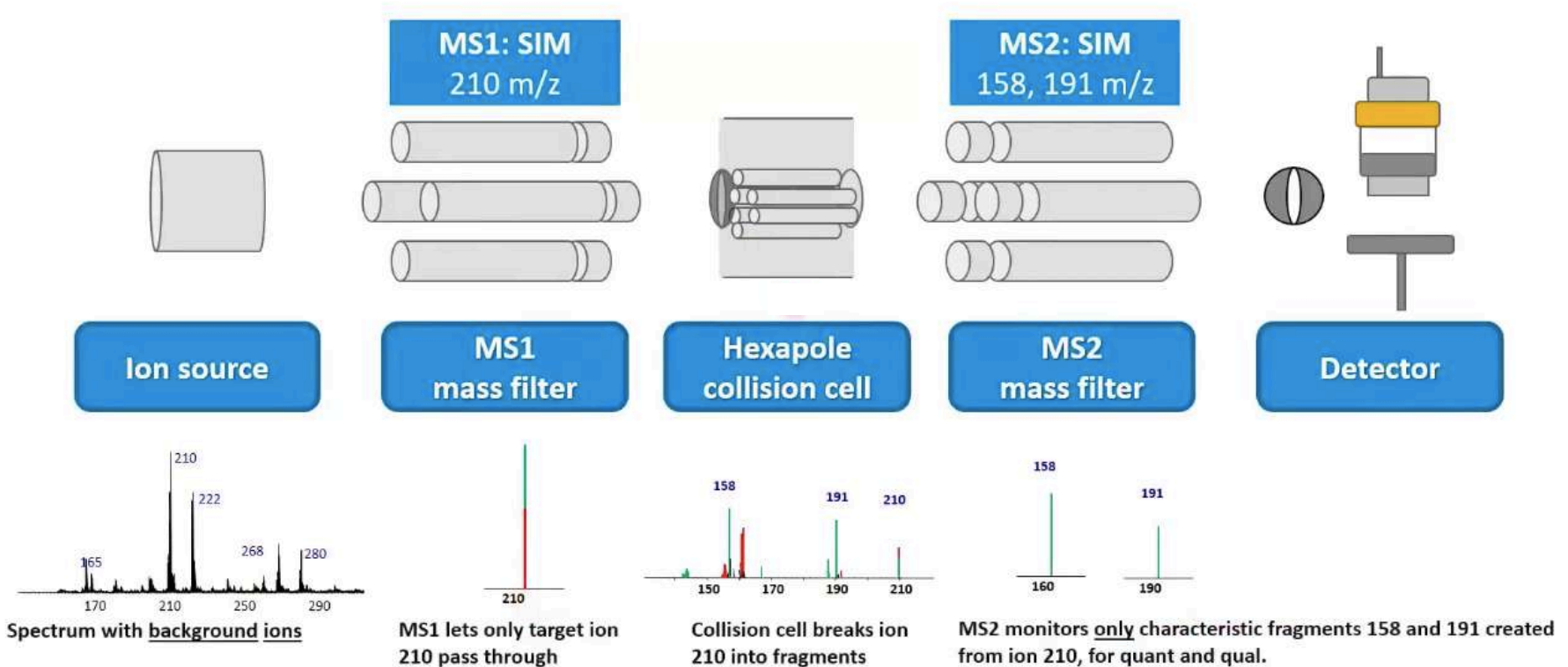
- Escasa información estructural. Menor capacidad de identificación.
- Imposibilidad de utilizar bibliotecas de espectros comerciales.
- Limitada al análisis de compuestos conocidos.
- Mayor posibilidad de falsos negativos (iones en la matriz)

Espectrometría de masa en tándem (MS/MS): Triple cuadrupolo



- Q1 escanea un rango de masas establecido y selecciona el ion de interés
- Q2 (q) o celda de colisión, enfoca y transmite los iones a medida que se introducen en la celda y permite el ingreso del gas de colisión.
- Q3 analiza los fragmentos que se generan en la celda de colisión

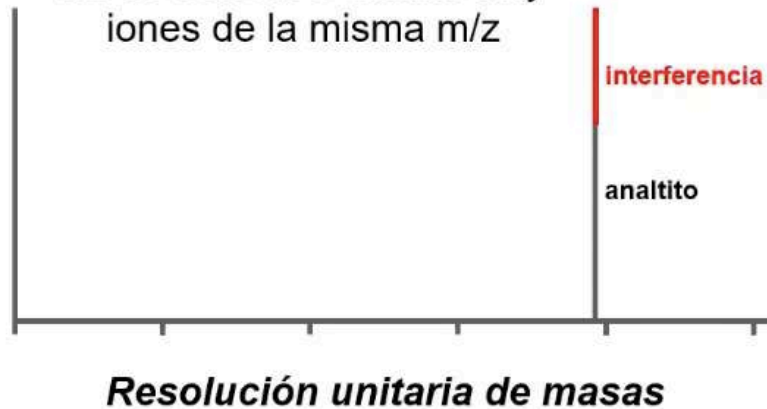
Espectrometría de masa en tándem (MS/MS): Triple cuadrupolo



Espectrometría de masa en tándem (MS/MS):

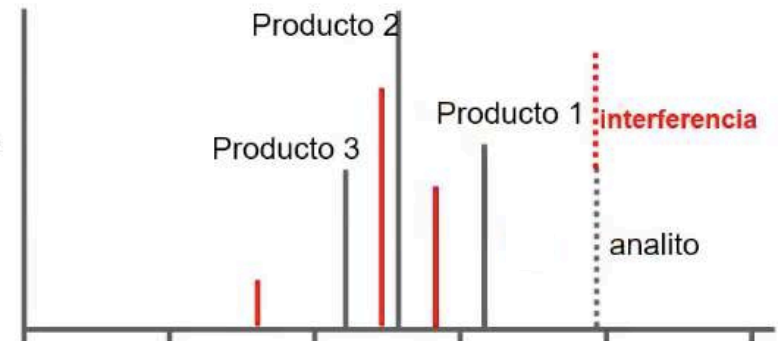
Single Quad MS

No es selectivo cuando hay iones de la misma m/z



Triple Quad MS

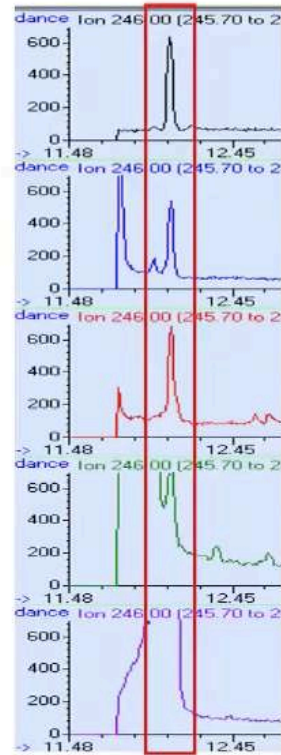
Selectividad por la selección de iones producto



Comparación: Cuadrupolo simple (SIM) y Triple Cuadrupolo (MRM). p,p'-DDE, 10 ppb



SIM (246)



Apple

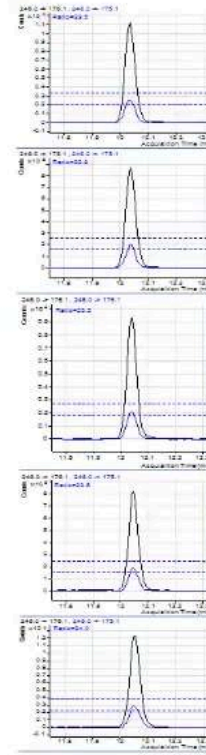
Cabbage

Ginseng

Orange

Spinach

MRM (246→175)



S/N = 448

S/N = 241

S/N = 446

S/N = 456

S/N = 260

(All injections = 1 μ L)

La alta selectividad de MS/MS permite la detección de trazas de plaguicidas de manera confiable para una gran cantidad de matrices.

Estos sistemas han sido impulsados principalmente por la complejidad de la matriz y de manera secundaria para resolver la coelución de los analitos.

Triple cuadrupolo: Desarrollo del método puede tomar días o semanas

- ✓ Optimización del método de GC
- ✓ Identificación de las transiciones MRM para cada compuesto
- ✓ Compra de estándares - \$\$\$\$\$\$
- ✓ Correr cada estándar en modo scan
- ✓ Seleccionar los posible/s iones precursor/es
- ✓ Correr scans de los iones producto
- ✓ Seleccionar las mejores transiciones
- ✓ Optimizar la energía de colisión
- ✓ Crear el método
- ✓ Probar y validar el método



GC/MS: targets, No-targets y Desconocidos

GC-MS scan



GC-MS SIM



**GC-MS/MS
TQ**

Targets, no-
targets &
desconocidos

Targets, con
alta
sensibilidad

Targets,
con alta
sensibilidad y
selectividad

GCxGC-TOF

GC-TOF

GC-MS/MS (Q-TOF)

ORBITRAP

¡Gracias!

