

Trabajo Fin de Grado

Producción de extractos representativos del aroma para desorción térmica y GC-O-MS

Production of aroma-representative extracts for further thermal desorption and GC-O-MS

Autor/es

Jorge Castellano Jaso

Director/es

Dr. Vicente Ferreira

Facultad de Ciencias
2021/2022

1 INTRODUCCIÓN	4
1.1 Cromatografía de Gases (GC)	4
1.2 Tipos de detectores.....	4
1.2.1 GC-FID.....	4
1.2.2 GC-MS.....	4
1.2.3 GC-O	5
1.3 Métodos de inyección	5
1.4 Tipos de adsorbentes	5
1.4.1 Tenax	6
1.4.2 Negro de Carbono Grafitizado	6
2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1 Reactivos	8
3.2 Muestras.....	8
3.3 Instrumentación.....	9
3.3.1 Desorción térmica	9
3.3.2 Sistema cromatográfico dual	10
3.4 Optimización del rango del detector.....	11
3.5. Optimización del método de inyección.....	11
3.5.1 Optimización del flujo de gas portador y tiempo de secado del trap externo	11
3.5.2 Optimización de la temperatura de secado del trap externo	11
3.5.3. Optimización del tiempo de desorción	12
3.5.4 Optimización de la temperatura de focalización del trap interno	12
3.6 Inyecciones con volúmenes mayores.....	12
3.7 Determinación de los índices de retención.....	12
3.8 Evaluación del proceso de optimización	12
3.9 Sesiones de olfatometría.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	12
4.1 Optimización del rango del detector.....	12
4.2 Optimización del tiempo de secado y flujo del gas portador	14
4.3 Optimización de la temperatura de secado del trap externo	16
4.4 Optimización de la temperatura de focalización del trap interno	17
4.5 Optimización del tiempo de desorción del trap interno	18
4.6 Inyecciones de volúmenes mayores	19
4.7 Determinación de índices de retención experimentales	23
4.8 Sesiones olfatométricas	24

5. CONCLUSIONES	26
REFERENCIAS.....	27
ANEXOS	29

RESUMEN

Debido a la incompatibilidad del diclorometano (disolvente clásico empleado para la extracción líquido-líquido de compuestos químicos) con el Tenax-TA, en este trabajo se desarrolló un método optimizado para la eliminación de éter en un sistema de desorción térmica mediante inyección líquida de la muestra sobre el propio cartucho de adsorbente. La optimización se llevó a cabo modificando diferentes parámetros de un sistema de desorción UNITY-xr, tales como tiempo de secado del trap externo, temperatura de focalización del trap interno, etc. Que influirán sobre el comportamiento del disolvente entre el sorbente del trap externo (Tenax-TA) y el sorbente del cold trap (General Purpose Carbon), por las diferentes fuerzas de interacción que actúan. Al aplicar las condiciones óptimas a dos disoluciones modelo diferentes (compuestas por distintos alcoholes y ésteres), se comprobó que los compuestos similares en tamaño al éter sobretodo, así como los compuestos más polares, sufrían los mayores porcentajes de pérdidas.

ABSTRACT

Due to the incompatibility of dichloromethane (classic solvent used for the liquid-liquid extraction of chemical compounds) with Tenax-TA, in this work, an optimized method was developed to eliminate ether in a thermal desorption system using liquid injection of the sample on the adsorbent cartridge itself. The optimization was carried out by modifying different parameters of a UNITY-xr desorption system, such as external trap drying time, internal trap focusing temperature, etc, which will influence the behaviour of the solvent between the external trap sorbent (Tenax-TA) and the cold trap sorbent (General Purpose Carbon), due to the different interaction forces that act. When applying the optimal conditions to two different model solutions (composed of different alcohols and esters), it was found that the compounds similar in size to the ether, as well as the more polar compounds, suffered the highest percentages of losses.

1 INTRODUCCIÓN

La desorción térmica es la técnica de inyección más potente de GC en cuanto a sensibilidad y posibilidad de automatización. Su uso para la elucidación del aroma en diversos productos alimentarios está plenamente justificado.¹⁻⁴ Sin embargo, dado que los aromas naturales incluyen moléculas de muy diverso rango de tamaños, polaridades y funcionalidades químicas, es vital asegurar que el adsorbente empleado es capaz de atrapar y posteriormente desorber dicho amplio rango de moléculas. Esto exige un control cuidadoso tanto del proceso de preconcentración, como del de desorción térmica, además de realizar una selección adecuada de materiales adsorbentes.

1.1 Cromatografía de Gases (GC)

La cromatografía de gases es una técnica analítica de separación avanzada para la caracterización de mezclas complejas cuyo objetivo es separar los distintos componentes que se encuentran en una muestra. La separación se produce como resultado de la diferente volatilidad de los componentes de la mezcla, así como de su capacidad de interacción con la fase estacionaria, lo que, en fases de naturaleza polar, está relacionado con la polaridad del analito. Las columnas capilares GC permiten una alta eficiencia cromatográfica, lo que permite obtener una gran capacidad de separación. La mayor parte de las separaciones se realizan en capilares con fases de reparto. Las fases de adsorción sólo se emplean, por sus peores características cromatográficas, en la separación de volátiles de bajo peso molecular.⁵⁻⁶

Las fases estacionarias de reparto se dividen a su vez, en apolares y polares; se suelen escoger las primeras por ser más resistentes química y térmicamente, pero con las segundas se pueden conseguir no sólo mayores retenciones relativas para compuestos más polares, sino que además mejores separaciones de analitos con diferencias estereoquímicas -la direccionalidad solo aparece en fases con estructuras polares direccionales-.⁷

1.2 Tipos de detectores

En cromatografía, existe un amplio abanico de detectores según las necesidades de cada determinación: desde los detectores integrados en el propio cromatógrafo (como los detectores FID, TCD, ECD, etc.) que cuantifican diferentes especies químicas, hasta detectores acoplados externamente, tales como espectrómetros de masas, puertos olfatométricos, etc.

1.2.1 GC-FID

El detector de ionización a llama (FID) fue introducido en 1958, y es el detector en GC más popular. Se rige según la medición de la conductividad eléctrica de una llama de aire/hidrógeno en la que se queman los componentes que salen de la columna.⁸

1.2.2 GC-MS

Cada vez es más común el acoplamiento de un espectrómetro de masas a la salida de un cromatógrafo de gases para obtener información estructural de los diferentes compuestos que conforman la muestra inyectada, debido a la complejidad en el análisis de disoluciones de extractos reales. Se basa en la separación de los iones de una muestra según su relación carga-masa.⁹

1.2.3 GC-O

La cromatografía de gases con detección olfatométrica (GC-O) se desarrolló en 1964 por Fuller, Steltenkamp y Tisserand.¹⁰ Esta metodología está compuesta por un cromatógrafo de gases al que se le incorpora un puerto olfatométrico, permitiendo que la propia nariz humana actúe como detector. De este modo, se identifican los diferentes compuestos mediante descriptores olfatométricos según eluyen por la columna. Es una de las técnicas más potentes utilizadas en el análisis de aromas ya que, aparte de poder diferenciar compuestos que coeluyen con sus olores característicos, la nariz humana tiene un límite de detección mucho más bajo que los detectores usados en GC.

Esta técnica se utiliza ampliamente en el estudio de compuestos volátiles del aroma en alimentos, bebidas alcohólicas y fragancias.

1.3 Métodos de inyección

La inyección líquida de la muestra en el inyector *Split/Splitless* es el método tradicional de inyección en cromatografía de gases. Se trata de un inyector de vaporización en el que la totalidad de la muestra inyectada y vaporizada (modo *Splitless*) o solo una parte de ella (modo *Split*) es transferida al interior de la columna. También puede realizarse la inyección directa en la columna capilar (*on-column*) mediante un vaporizador con temperatura programada (o PTV por sus siglas en inglés). Si se tratase de una muestra gaseosa, además de las inyecciones mediante jeringas, pueden inyectarse mediante un sistema de válvulas.

Otros ejemplos de técnicas de inyección no convencionales son las desorciones térmicas y los inyectores de espacio de cabeza. En las primeras, las muestras son capturadas o concentradas en sorbentes que pueden desorberse de forma directa dando lugar a sistemas automáticos de análisis (sistemas de purga y trampa, sistemas de desorción térmica). Casos particulares son la microextracción en fase sólida o SPME (en la que la muestra se preconcentra en un sorbente fijado en la punta de una jeringa y se desorbe en un inyector de vaporización) o la extracción con barra de agitación (SBSE, similar a SPME pero trabajando con una barra de agitación en vez de una jeringa) y que habrá de ser desorbida en un sistema de desorción térmica.¹¹

De las técnicas de inyección mencionadas, cabe destacar la desorción térmica por su auge. En esta técnica, los compuestos volátiles son previamente retenidos en el sorbente. Debido a que este proceso es lento, es preciso incluir una etapa de concentración de los mismos en una trampa fría, a fin de evitar que los picos se ensanchen.

1.4 Tipos de adsorbentes

Existe una amplia variedad de sorbentes empleados en desorción térmica, los cuales podrían dividirse en tres grandes familias:¹²

- Adsorbentes clásicos: sílica, alúmina y carbón grafitizado. Se emplean en el análisis de hidrocarburos ligeros -C1 a C5- y freones.
- Tamices moleculares: zeolitas sintéticas y tamices carbonáceos. Usados para gases atmosféricos. Muy sensibles a la humedad, y adsorben irreversiblemente CO₂.
- Polímeros orgánicos porosos. Excelentes para la separación de compuestos polares. Los mecanismos de separación son mezcla de adsorción y reparto.

En desorción térmica, la utilización de polímeros está ampliamente extendida para diferentes métodos de extracción de compuestos volátiles. Destacan sobre todo las resinas poliméricas

denominadas Tenax. Otros polímeros de nueva generación como el Bond Elut ENV o LiChrolut EN a pesar de tener ventajas, apenas son empleados en sistemas de desorción térmica.¹³ También se emplea con frecuencia carbón grafitizado, aunque su uso está menos extendido debido a su impredecible pérdida de retención que se atribuye a la contaminación del adsorbente.

1.4.1 Tenax

El Tenax (marca registrada por Buchem B.V.) es una resina polimérica porosa -poli(óxido de 2,6-difenil-p-fenileno) o PPPO- basada en la polimerización oxidativa del 2, 6-difenilfenol. Se usa principalmente en el análisis de volátiles en el aire o en líquidos, y en la detección de compuestos químicos en alimentos.¹⁴

Es un material con pocas impurezas y con poco sangrado, además de muy estable térmicamente (hasta los 350°C). Es muy reactivo frente a agentes oxidantes como cloro, ozono, y óxidos de nitrógeno y azufre, formando acetofenona, benzaldehído y fenol. Los volúmenes de ruptura en Tenax son muy bajos para compuestos muy volátiles. Aunque tiene poca afinidad con el agua, la humedad en el aire puede hacer que los volúmenes de ruptura disminuyan.

Las variantes de Tenax comercializadas son:

- Tenax GC (sustituido por Tenax TA)
- Tenax TA (mesh 20-35, 35-60, 60-80, 80-100, 100-200)
- Tenax GR: 23% grafito (mesh 20-35, 35-60, 60-80, 80-100)
- Tenax TAP: Tenax-TA ultrapuro preparado mediante extracción soxhlet.
- Tenax Disc: fibras de Tenax en forma de disco

1.4.2 Negro de Carbono Grafitizado

El negro de carbono grafitizado (GCB por sus siglas en inglés) se produce mediante tratamiento térmico del carbón grafitizado. Está compuesto por múltiples coloides agregados, unidos mediante fuerzas débiles de Van der Waals. Aunque a nivel coloidal sean muy diferentes, la estructura atómica del GCB es similar a la del carbón poroso grafitizado o PGC (Figura 1).

No es muy resistente a esfuerzos mecánicos, y su superficie heterogénea lo hacen inadecuado para la cromatografía líquida, pero está ampliamente extendido en GC y en SPE.¹⁵

La principal diferencia entre el PGC y el grafito es la orientación tridimensional de las sucesivas capas de carbono, ya que no están orientadas de forma regular.

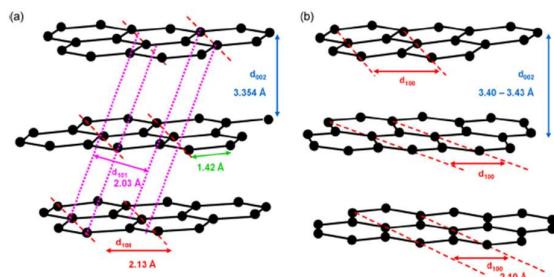


Figura 1. Estructuras atómicas del grafito.¹⁶ A la izquierda, grafito tridimensional con ordenamiento entre capas ABAB; a la derecha, PGC bidimensional sin ordenamiento entre capas.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Los sistemas de desorción térmica permiten la inyección en los sistemas GC de cantidades altas de material volátil de una forma muy precisa. Sin embargo, su calibración puede ser complicada debido a la dificultad asociada a la introducción de cantidades calibradas de los volátiles, lo que habitualmente se realiza a partir de disoluciones en disolventes volátiles, cuya introducción en los sistemas de desorción térmica no es trivial, particularmente si se introduce un volumen mayor a 1 μL .

Por otra parte, la mayor parte de los sistemas de extracción en fase sólida no pueden adaptarse a los *inserts* empleados en la desorción térmica. Por esta razón, la desorción debe realizarse vía disolvente, lo que requiere la preparación de un extracto líquido. La inyección de este extracto líquido en un inyector de vaporización clásico debe limitarse a 1 o 2 μL , ya que este tipo de inyectores no soportan volúmenes mayores. Si la inyección se realizará en un sistema de desorción térmica, podría idealmente, introducirse un volumen mucho mayor, siempre y cuando fuéramos capaces de evaporar el disolvente sin perder los analitos. En ambos casos, por tanto, existe la necesidad de introducir un volumen apreciable de extracto en un sistema de desorción térmica. En el primero con el fin de calibrar el sistema con un volumen que se pueda medir con exactitud, en el segundo con el fin de introducir en la columna GC una cantidad de material volátil previamente aislado en el sistema SPE mayor a la que se puede introducir en los inyectores de vaporización.

Ya que el Tenax se ha convertido en uno de los adsorbentes poliméricos más extendidos debido a su versatilidad, estabilidad térmica y bajo coste, surge la necesidad de aprender a introducir volúmenes de extractos líquidos conteniendo volátiles sobre cartuchos de Tenax.

Por esta razón, el objetivo de este trabajo de fin de grado es optimizar las condiciones en las que los volátiles contenidos en extracto líquidos de disolventes afines al Tenax TA, pueden ser introducidos en los sistemas de desorción térmica. Para ello se evaporará el disolvente antes del proceso cromatográfico a fin de que no lo distorsione, sin perder el material volátil presente en el extracto.

Como disolvente se ha elegido el éter, ya que el diclorometano no es compatible con el Tenax,¹⁷ El objetivo es eliminar más del 90% del disolvente sin eliminar más del 10% de los analitos más volátiles. Como analitos tipo se han empleado alcanos de entre 8 y 10 átomos de carbono en la primera parte del estudio.

Para ello, se optimizarán los siguientes parámetros durante el proceso de desorción térmica: tiempo de secado del trap externo, flujo de gas portador, temperatura de focalización en el trap interno o cold trap, y tiempo de desorción del trap interno.

Además, el presente trabajo tiene otros objetivos formativos que son los siguientes:

- Búsqueda bibliográfica
- Diseño de experimentos
- Ejecución de tareas experimentales, como la preparación de disoluciones
- Ejecución de tareas instrumentales avanzadas, como la cromatografía de gases con desorción térmica.
- Obtención y evaluación de datos cromatográficos
- Transcripción, interpretación y discusión de resultados

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Reactivos

Se empleará éter dietílico de calidad GC (>95%) del proveedor VWR International (Lovaina, Bélgica) como disolvente. Los alcanos octano, nonano, decano, undecano, dodecano, tridecano, tetradecano y pentadecano usados fueron de Sigma Aldrich (Madrid, España) con un grado de pureza GC (>95%). Los ésteres acetato de etilo, propanoato de etilo, butirato de etilo, pentanoato de etilo y hexanoato de etilo, y los alcoholes isoamílico, isopropanol, butanol, isobutanol, pentanol, hexanol y heptanol utilizados fueron del proveedor Sigma Aldrich (Madrid, España) con un grado de pureza superior al 95%.

3.2 Muestras

Para evaluar el proceso de optimización del sistema de desorción se utilizarán las siguientes disoluciones:

- 1) Disolución A: compuesta por octano, nonano y decano al 0,3% en peso en, que se hará a partir de una disolución madre al 25% en peso en éter éter (Tabla 1).
- 2) Disolución B: compuesta por octano, nonano y decano al 0,04% en peso en éter, que se hará a partir de la disolución A (Tabla 1).

Tabla 1. Disoluciones de octano, nonano y decano en porcentaje en peso en éter.

Compuesto	Disolución A (disolución 0,3%)		Disolución B (disolución 0,04%)	
	Concentración (mg/L)	Porcentaje en peso	Concentración (mg/L)	Porcentaje en peso
Octano	2206,9	0,308	256,3	0,0358
Nonano	2207,4	0,308	256,3	0,0358
Decano	2279,1	0,318	264,6	0,0370

- 3) Disolución C y disolución D: preparadas a partir de la disolución B, y corresponden a dos diluciones en éter, 1:5 y 1:10, respectivamente.
- 4) Disolución E: compuesta por los alcanos lineales desde C8 hasta C15 en concentraciones aproximadas de 30 mg/L (Tabla 2). Los alcanos desde C8 hasta C10 se tomarán de la disolución B; los alcanos desde C11 hasta C15, de una disolución madre de 1000 mg/L.

Tabla 2. Disolución de alcanos lineales desde C8 hasta C15 en éter
(Disolución E)

Alcano	Concentración (mg/L)
C8	19,1
C9	19,1
C10	19,7
C11	30,2
C12	31,8
C13	31,4
C14	30,6
C15	30,0

- 5) Disoluciones F y G: Se preparó una disolución de ésteres “concentrada” (disolución F) de concentraciones variables de diferentes ésteres etílicos. Se preparó una disolución

“diluida” (disolución G, con una dilución 1:10) a partir de la disolución F (ver ambas en Tabla 3).

Tabla 3. Concentración (mg/L) de las disoluciones de ésteres

Compuesto	Disolución F (concentrada)	Disolución G (diluida)
	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)
Hexanoato de etilo	10,6	1,0
Pentanoato de etilo	63,3	6,0
Butanoato de etilo	52,0	4,9
Propanoato de etilo	190,7	18,1
Acetato de etilo	118,2	11,2

- 6) Disoluciones H e I: Se preparó una disolución de diferentes alcoholes “concentrada” (disolución H) de concentraciones variables. Se preparó una disolución “diluida” (disolución I, con una dilución 1:10) a partir de la disolución H (ver ambas en Tabla 4).

Tabla 4. Concentración (mg/L) de las disoluciones de alcoholes

Compuesto	Disolución H (concentrada)	Disolución I (diluida)
	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)
Isobutanol	95,3	7,3
1-butanol	302,1	23,2
Pentanol	9,8	0,8
1-hexanol	48,0	3,7
1-heptanol	9,3	0,7
Alcohol isoamílico	95,0	7,3
Isopropanol	300,4	23,0

3.3 Instrumentación

3.3.1 Desorción térmica

El sistema de desorción térmica consiste en una unidad UNITY-xr acoplada a la primera dimensión del sistema cromatográfico dual. El UNITY-xr actuará como inyector de la muestra. El proceso de desorción consta de cuatro etapas esenciales, como se muestra en la Figura 2.

La inyección de la muestra se realiza sin flujo en el conducto del tubo de muestra (Figura 2a). En la Figura 2b, se establece un tiempo de secado a una temperatura baja (sujeto a optimización) para eliminar el disolvente mediante una purga del tubo en sentido contrario del muestreo (dry purge) y garantizar que los analitos presentes en la muestra líquida inyectada se adsorban en el adsorbente. Posteriormente, y una vez acabado el secado, se desorben los compuestos adsorbidos a una temperatura de entre 200 y 400°C (Figura 2c), con un tiempo de desorción variable (sujeto a optimización). A su vez, un gas portador (He o N₂) arrastra los compuestos a una trampa fría, que contiene una mezcla de dos negros de carbono grafitizado como relleno. Los compuestos se concentran en la trampa fría, como se muestra en la Figura 2c.

La temperatura a la que se lleva a cabo este proceso es variable (sujeto a optimización), entre los -10°C y 50°C.

Tras la concentración, se realizará la desorción de la trampa fría (Figura 2d) a una temperatura de 320°C, con un gradiente de calentamiento de 40°C/s. Los analitos se transfieren a la columna cromatográfica mediante una línea de transferencia a una temperatura de 250°C, para evitar que condensen en este proceso.¹⁸

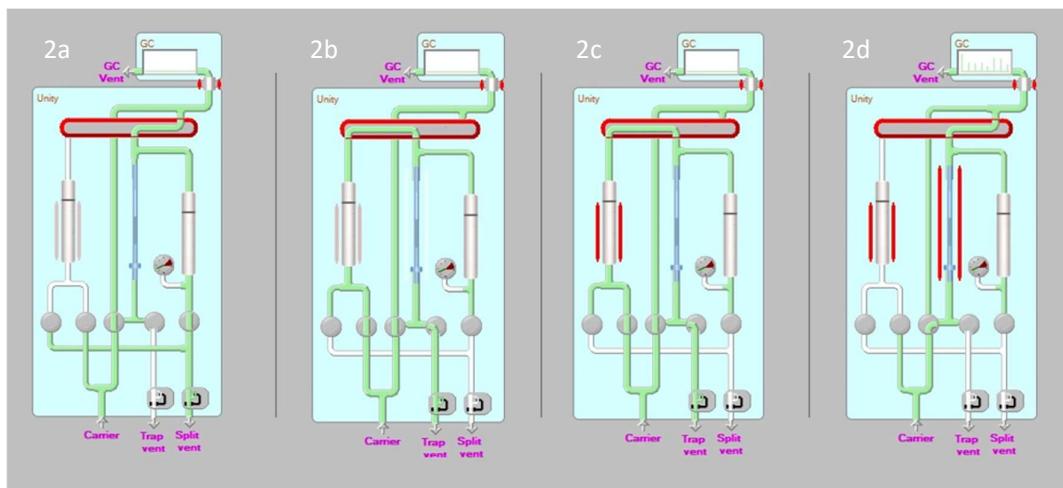


Figura 2. El orden de las etapas del proceso es, de izquierda a derecha: Introducción de la muestra (2a), secado (2b), desorción del trap externo y focalización en el trap interno (2c), desorción del trap interno e inyección al cromatógrafo (2d). Las líneas verdes simbolizan el flujo del gas por el circuito; si las líneas son rojas, implican un proceso de calentamiento. El trap externo es aquel que se encuentra a la izquierda en los diagramas; el trap interno está representado como un tubo de color azul.

Se usará helio como gas portador, con una presión de 30 psi. La temperatura de calentamiento del trap externo será fija de 300°C.

El adsorbente utilizado en el trap externo fueron tubos de Tenax TA, comercializados por Supelco. Los tubos de Tenax TA fueron acondicionados entre muestras para corregir posibles efectos memoria en el adsorbente. El acondicionamiento de los tubos se realizó durante 15 minutos a una temperatura de 330°C, dentro de la unidad de desorción UNITY-xr.

Los tubos de Tenax-TA y el sistema UNITY-xr provienen de MARKES International (Cardiff, Reino Unido).¹⁹

3.3.2 Sistema cromatográfico dual

Para realizar la separación cromatográfica se utilizará un sistema cromatográfico dual GC-O-FID-GC-O-MS, formado por dos cromatógrafos Varian (Walnut Creek, CA, USA) independientes e interconectados por una válvula Deans y una conexión termorregulada a 200°C.

La primera dimensión -cromatógrafo 1- es un modelo CP-3800 al que está conectado la unidad de desorción térmica UNITY-xr. Además, está equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un puerto olfatométrico (ODO-II de SGE, Ringwood, Australia). Ambos están conectados por un divisor de flujo a la salida de la columna, de manera que se puede realizar la detección simultánea del compuesto en elución por el FID y por el puerto olfatométrico. Este cromatógrafo también cuenta con una válvula Deans de flujo impulsado por presión (Valco

Instruments, Houston, TX, USA), que permite transferir de manera limpia y precisa fracciones eluyendo de la columna a la segunda dimensión, en la que serán recromatografiadas en una fase de polaridad distinta y detectadas en el sistema de detección instalado a la salida de la segunda columna. El cromatógrafo de la primera dimensión está dotado de una columna polar DB-WAX de dimensiones 30 m x 0,32 mm x 0,50 µm (Agilent J&W, Folsom, CA, USA), con una precolumna de sílica fundida sin fase y desactivada, de dimensiones 3 m x 0,32 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Se estableció un flujo de 20 mL/min de helio como gas portador, y una presión de 20 psi, ambos constantes. El programa de temperaturas del horno comenzó con 35°C, temperatura que mantuvo durante 5 minutos; a continuación, se aplica una rampa de 4°C/min hasta llegar a los 80°C, tras lo cual se sube la temperatura a 20°C/min hasta los 220°C, haciendo que el tiempo total del cromatograma sea de 23,25 minutos. El detector FID se mantiene en los 300°C.

La segunda dimensión -cromatógrafo 2- es también un modelo CP-3800 acoplado a un detector de espectrometría de masas de trampa de iones Saturn 2200.²⁰⁻²¹

3.4 Optimización del rango del detector

Para inyectar la disolución a cuantificar en el sistema cromatográfico, se tomarán 10 µL de la disolución A con una jeringuilla SGE de TRAJAN (Barcelona, España) y se adicionarán sobre el adsorbente del tubo de Tenax-TA a temperatura ambiente. Este tubo de Tenax-TA se introducirá rápidamente dentro del sistema de desorción térmica UNITY-xr. Para poder cuantificar el pico del disolvente, se inyectó esta disolución y se midió en rangos del detector de 9, 10, 11 y 12.

3.5. Optimización del método de inyección

Las condiciones a optimizar serán el caudal de gas portador, el tiempo de secado del trap externo, el tiempo de desorción del trap interno, la temperatura de secado del trap externo, la temperatura de focalización del trap interno y los volúmenes de inyección de muestra.

3.5.1 Optimización del flujo de gas portador y tiempo de secado del trap externo

Mediante la inyección de 10 µL de la disolución A, se evaluará la influencia del caudal del gas portador comparando flujos de 20 y 50 mL/min. A su vez, se probarán distintos tiempos de secado del trap externo con cada flujo, aumentando el secado progresivamente: se empezará inyectando la muestra sin secado (será la referencia del resto de inyecciones), para después añadir un tiempo de secado de 1 minuto, 2 minutos, 5 minutos y 10 minutos.

Posteriormente se hará otra evaluación de los mismos parámetros anteriormente expuestos con la disolución B (menos concentrada), inyectando también 10 µL a temperatura ambiente. Además, se evaluarán los tiempos de secado de 30 minutos y una hora, únicamente con caudal de 20 mL/min.

3.5.2 Optimización de la temperatura de secado del trap externo

Se modificará la temperatura de secado del trap externo inyectando 10 µL de la disolución B con las condiciones optimizadas del apartado anterior. Tomando como referencia un secado de 10 minutos a 30°C, se programará el secado de esta manera: los primeros 5 minutos a 30 °C, y los siguientes 5 minutos a 40°C o a 50°C, únicamente con el caudal de gas portador de 20 mL/min.

3.5.3. Optimización del tiempo de desorción

Inyectando 10 µL de la disolución B en las condiciones de secado y flujo optimizadas en las etapas anteriores, se evaluará la influencia del tiempo de desorción de los compuestos adsorvidos en el trap interno, siendo el tiempo predeterminado de 5 minutos, y probando con 3 y 8 minutos de desorción.

3.5.4 Optimización de la temperatura de focalización del trap interno

La variación de la temperatura de focalización del trap interno se optimizará tomando como referencia la focalización a -10°C, con inyecciones a 10°C, 20°C y 30°C, inyectando 10 µL de la disolución B en las condiciones óptimas del resto de parámetros.

3.6 Inyecciones con volúmenes mayores

Se pretende introducir la misma masa de analito inyectando mayores volúmenes de disoluciones más diluidas. Para ello se inyectarán 50 µL de la disolución C, y 100 µL de la D (diluciones 1:5 y 1:10 de la disolución B, respectivamente). En ambos casos, se volverán a evaluar los tiempos de secado del trap externo, la temperatura de focalización del trap interno y los tiempos de desorción de este último, tomando como referencia los resultados de las condiciones optimizadas obtenidos con la inyección de 10 µL de la disolución B. El objetivo en este apartado será comprobar que un aumento del volumen de inyección no afecta a la eficiencia de la determinación con los parámetros optimizados hasta ahora, y en caso contrario, evaluar las nuevas mejores condiciones para cada volumen de inyección.

3.7 Determinación de los índices de retención

Para calcular los índices de retención experimentales de los compuestos funcionales que se determinarán posteriormente, se inyectarán 10 µL de la disolución E (disolución de alcanos) en las condiciones óptimas evaluadas para este volumen.

3.8 Evaluación del proceso de optimización

Se evaluará, de manera similar al apartado 3.6, las condiciones en diferentes volúmenes de inyección de las disoluciones con compuestos de diferente naturaleza química. Las disoluciones F y H (“concentradas”) se inyectarán en las mismas condiciones que se consideran óptimas para la disolución B; las disoluciones G e I (“diluidas”) se inyectarán según los parámetros óptimos de la disolución D. Se comprobará que no hay pérdida de los compuestos al modificar las variables de inyección.

3.9 Sesiones de olfatometría

Los parámetros a evaluar serán el tiempo en el cromatograma en el que se percibe el aroma, el descriptor de olor y la intensidad del mismo -en una escala de 0 a 3 según la intensidad del mismo, donde los valores medios también están permitidos-.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Optimización del rango del detector

Se optimizó el rango de detector para poder cuantificar el pico del disolvente, para lo cual se probó con diferentes rangos de detección (9, 10, 11 y 12). Se puede observar en la Figura 3 que el mejor rango del detector FID es 11 (línea negra) para la cuantificación del éter, y rango 12 (línea azul) para el octano, nonano y decano. La abundante masa de éter inyectada provoca que el pico se salga del rango de detección si se fija el rango en 12 para toda la adquisición, por lo que

no es cuantificable. Por otra parte, fijar el rango en 11 implica perder sensibilidad en la cuantificación del octano, nonano y decano, al ser picos notablemente más pequeños que el del disolvente.

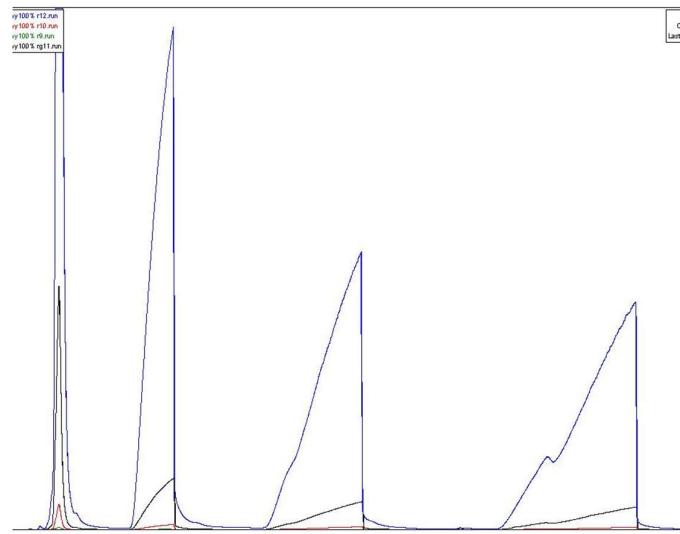


Figura 3. Comparación de los cromatogramas con distintos rangos de detección del FID según el siguiente código de colores: rango 9 (verde), rango 10 (rojo), rango 11 (negro) rango 12 (azul).

Por estas razones el rango de detección programado para el FID será fijo en rango 11 durante los 4,45 primeros minutos del cromatograma; a partir de entonces será de rango 12. En la Figura 4 se observa el cromatograma óptimo para el rango, con los cambios en las alturas de los picos. De esta manera, se consigue cuantificar el pico de éter (que eluye en el minuto 3,90), sin perder sensibilidad en el resto de los picos de analitos.

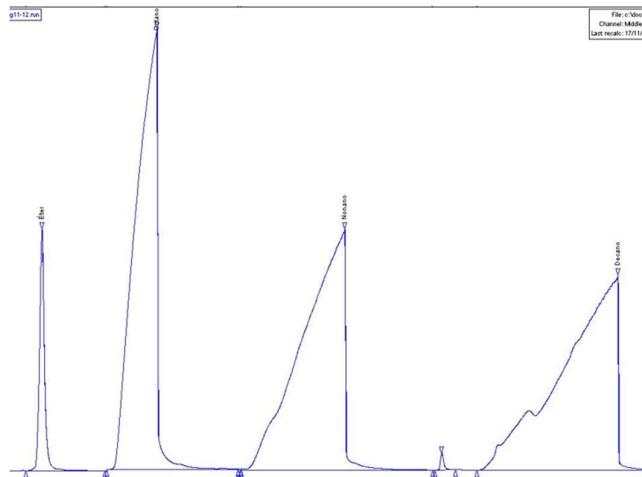


Figura 4. Cromatograma con programación del detector de rango 11 hasta el minuto 4,45 y rango 12 hasta final del cromatograma. El orden de los picos es, de izquierda a derecha, éter, octano, nonano y decano.

Se aprecia claramente que los picos están saturados, pues en todos ellos se producen colas, además de que son muy anchos (fronting). Esto es debido a que la masa de analito inyectada es demasiado grande, por lo que se procede a hacer una dilución para conseguir resultados mejores.

4.2 Optimización del tiempo de secado y flujo del gas portador

En primer lugar, se debe conocer el flujo del gas portador óptimo. Por ello, se inyectan 10 μ L de la disolución A, con diferentes tiempos de secado (se probarán tiempos de secado de 1, 2, 5 y 10 minutos en primera instancia) con dos caudales diferentes: 20 mL/min (Figura 5 y ANEXO I) y 50 mL/min (Figura 6 y ANEXO II).

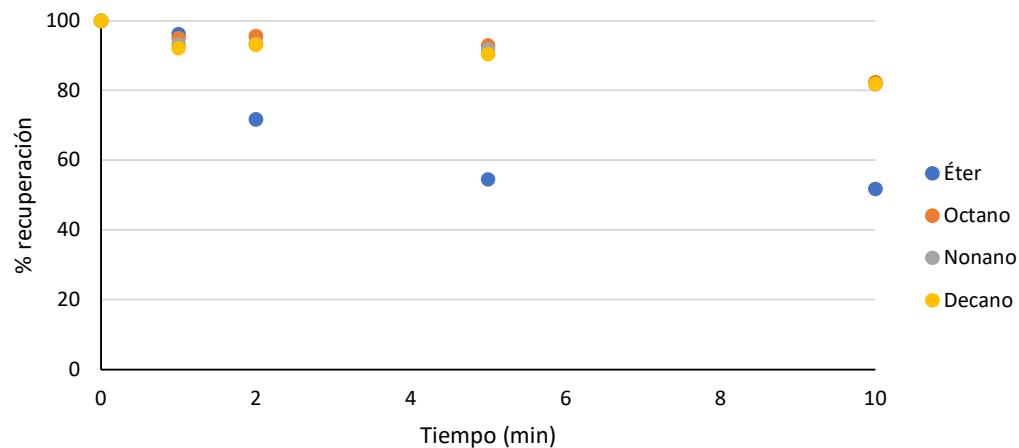


Figura 5. Representación del porcentaje de recuperación de los compuestos de la disolución A frente a distintos tiempos de secado del trap externo. Condiciones fijas: caudal de gas portador de 20 mL/min, temperatura de focalización del trap interno de -10°C, tiempo de desorción del trap interno de 5 min.

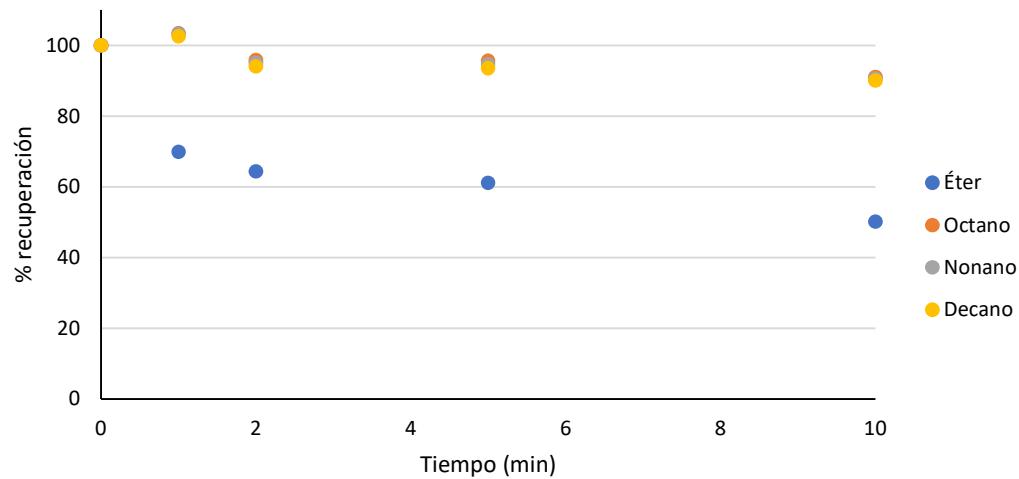


Figura 6. Representación del porcentaje de recuperación de los compuestos de la disolución A frente a distintos tiempos de secado del trap externo. Condiciones fijas: caudal de gas portador de 50 mL/min, temperatura de focalización del trap interno de -10°C, tiempo de desorción del trap interno de 5 min.

Al ser una concentración demasiado elevada de analitos dentro de la columna (tal y como se observó en el apartado 4.1), se inyectan 10 μ L de la disolución B con los mismos parámetros

de caudal y tiempo de secado a optimizar (Figuras 7 y 8, y las Tablas en ANEXOS III y IV, respectivamente).

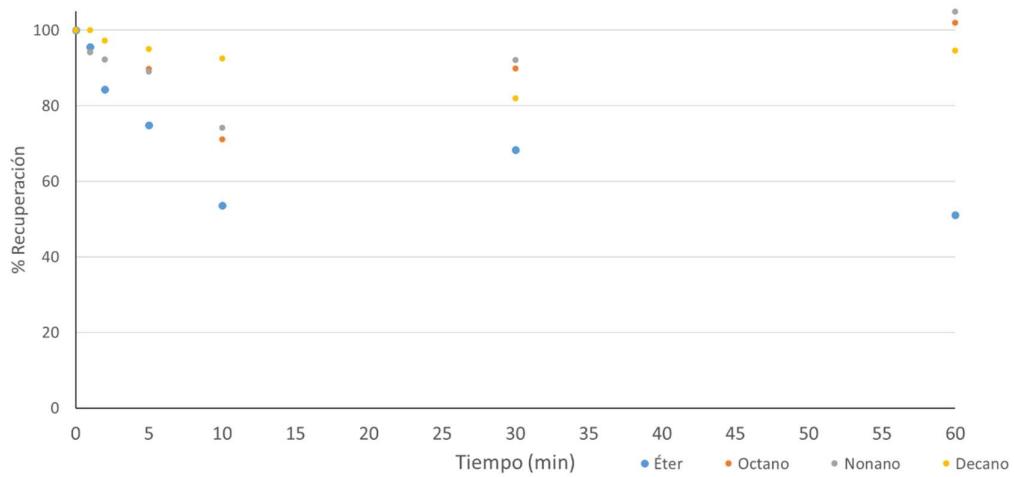


Figura 7. Representación del porcentaje de recuperación de los compuestos de la disolución B frente a distintos tiempos de secado del trap externo. Condiciones fijas: caudal de gas portador de 20 mL/min, temperatura de focalización del trap interno de -10°C, tiempo de desorción del trap interno de 5 min.

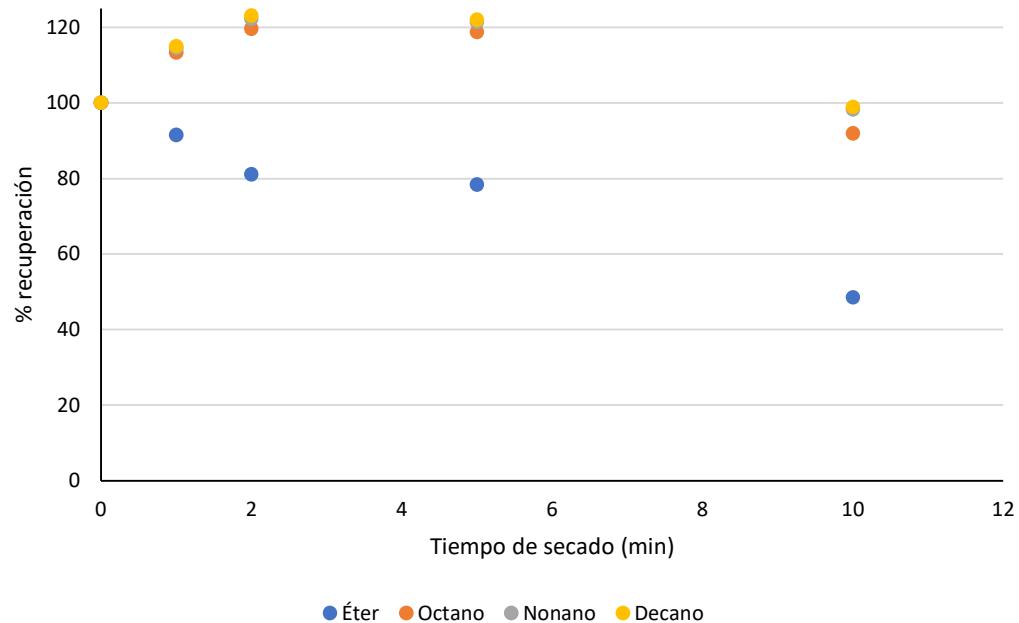


Figura 8. Representación del porcentaje de recuperación de los compuestos de la disolución B frente a distintos tiempos de secado del trap externo. Condiciones fijas: caudal de gas portador de 50 mL/min, temperatura de focalización del trap interno de -10°C, tiempo de desorción del trap interno de 5 min.

Tanto en las Figuras 5 y 6 como en las Figuras 7 y 8 se observa que es imposible eliminar cuantitativamente el éter (>90%), ya que, a pesar de prolongar la etapa de secado durante más de

10 minutos, el porcentaje de éter no descendió del 50%. No solo eso, la tendencia que muestra es muy alejada de un decaimiento exponencial, que sería el resultado esperado si el éter se evaporara de forma ideal.

De hecho, de acuerdo con la fórmula de decaimiento exponencial (Ecuación 1):²²

$$N = N_0 e^{-\lambda t} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde N es la concentración de analito pasado un tiempo t (que se supondrá de 10 minutos para calcular las constantes de decaimiento, λ) y N_0 es la concentración inicial de analito. Es teóricamente posible estimar, a partir de las 4 situaciones estudiadas, que los tiempos de secado necesarios para evaporar más de un 90% de éter deberían de ser en promedio 35 minutos, aproximadamente. Sin embargo, cuando 10 μL de la disolución B son inyectados y secados con un caudal de 20 mL/min y tiempos de secado de 30 o 60 minutos, puede comprobarse en la Figura 7 que el porcentaje de éter remanente sigue sin bajar del 50%.

Como puede apreciarse comparativamente en las Figuras 7 y 8, al usar un flujo bajo (20 mL/min), se evapora menos éter, de manera que la presencia de cantidades mayores de este componente afecta negativamente a la retención del resto de compuestos. Al usar un flujo mayor (50 mL/min), se consigue evaporar más éter y se evitan efectos sobre la retención del resto de analitos.

También se observa que los compuestos más ligeros de la serie de alkanos sufren pérdidas más marcadas (ver Figura 7).

En cualquier caso, este experimento permite concluir que no es posible eliminar el éter de manera completa en la etapa de secado, probablemente porque una pequeña fracción del mismo es fuertemente adsorbida en el Tenax, de manera que se considera óptimo el tiempo de secado de 2 minutos. Por otra parte, el flujo considerado óptimo para esta operación de secado fue 50 mL/min.

4.3 Optimización de la temperatura de secado del trap externo

Se consideró la posibilidad de modificar la temperatura de secado del trap externo, teniendo en cuenta que la temperatura de ebullición del éter dietílico es 34,6 °C. Teóricamente, con una temperatura de secado del trap externo superior a la temperatura de ebullición del éter, gran parte del mismo se debería perder durante la etapa de secado del trap externo, consiguiendo entonces porcentajes de éter remanente mucho menores, y porcentajes de recuperación de los analitos similares.

Se inyectan 10 μL de la disolución B con un flujo de gas portador de 20 mL/min y un tiempo de secado de 10 minutos, un tiempo de secado lo suficientemente largo como para dejar un porcentaje de éter residual relativamente bajo en la etapa de secado. Se programaron dos rampas en la temperatura de secado del trap externo. La primera (rampa 1) comienza a 30°C durante los primeros 5 minutos para luego subir la temperatura hasta los 40°C. La segunda rampa (rampa 2) será similar, empezando con una temperatura igual a 30°C durante los primeros 5 minutos para subir hasta los 50°C en los 5 minutos posteriores. En la Tabla 5 se observa que, comparando las inyecciones en las mismas condiciones en el apartado 4.2, los cambios en los porcentajes de éter restante y en los porcentajes de recuperación de analitos son casi inapreciables y por tanto, modificar la temperatura de secado del trap externo no tiene efecto.

Tabla 5. Porcentajes de recuperación en la disolución B con dos rampas de temperatura de secado del trap externo diferentes (hasta 40 y hasta 50 °C) y un flujo de 20 mL/min.

% recuperación	Rampa 1	Rampa 2
Éter	83,6	93,3
Octano	77,2	87,9
Nonano	80,2	91,2
Decano	85,8	101,4

Por estas razones, se estableció que la temperatura de secado del trap externo fuera únicamente de 30°C, ya que modificarla no implica mejoras en la eliminación del éter.

4.4 Optimización de la temperatura de focalización del trap interno

Los resultados anteriores indican que el éter interacciona con el Tenax TA con demasiada intensidad, lo que explica que no sea posible la eliminación completa de este disolvente en la etapa de secado. Esto implica que en esta etapa del proceso no podemos evitar la presencia de cantidades residuales y relevantes de éter que serán transferidos durante la desorción al siguiente punto del sistema analítico, constituido por una trampa fría de preconcentración.

Como el adsorbente de esta trampa puede elegirse, hemos instalado un adsorbente carbonoso (carbón grafitizado) con la esperanza de que sea capaz de mostrar menor interacción con el éter, lo que permitiría evitar su retención en condiciones en las que los analitos, más pesados, pueden ser retenidos. Para ello, se inyectan 10 µL de la disolución B en las condiciones anteriormente optimizadas, variando la temperatura del trap interno de los -10°C iniciales a 10, 20 y 30 °C. Se toma como referencia una inyección previa con las condiciones consideradas óptimas (un tiempo de secado del trap interno de 2 minutos y un caudal de 50 mL/min) con una temperatura de focalización del trap interno de -10 °C.

Como se observa en la Figura 9, los porcentajes de recuperación del éter son notablemente más bajos que los obtenidos en las condiciones estándar de inyección (-10°C).

A 10°C, el porcentaje de éter residual es de 9,8%, a 20°C de 3,8% y a 30°C de 3,3% . Por esta razón, se considera que la temperatura de 30°C es la óptima para la trampa fría por ser el valor más bajo de éter. Estas mayores temperaturas en ningún caso han provocado pérdidas de los analitos, que comparando el octano (al ser el alcano más ligero y por tanto más volátil, con mayores porcentajes de pérdida) entre las tres inyecciones a distintas temperaturas, se obtienen porcentajes de recuperación de 110,9% a 10°C, 110,8% a 20°C y 100,7% a 30° C (tablas con estos valores en ANEXOS V, VI, VII y VIII).

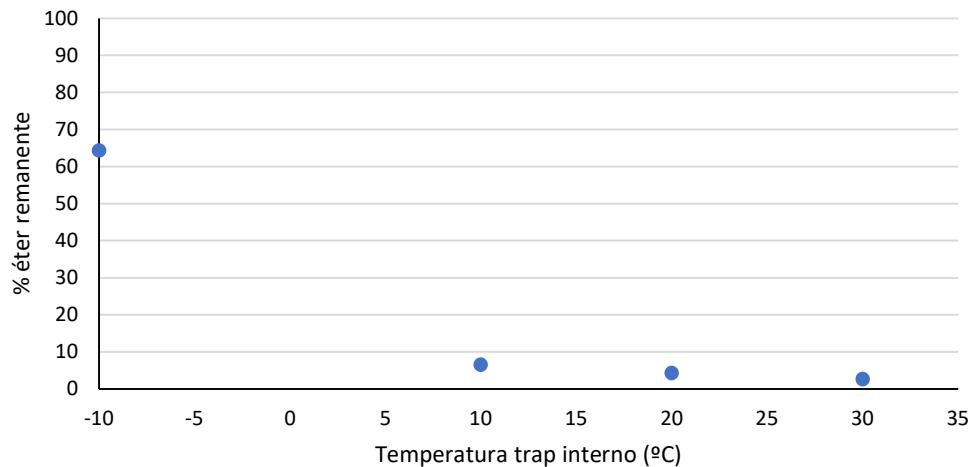


Figura 9. Porcentaje de éter residual frente a temperatura de focalización del trap interno. Las condiciones que se mantuvieron fijas fueron los tiempos de secado y caudal de gas portador considerados óptimos.

4.5 Optimización del tiempo de desorción del trap interno

La última variable a optimizar será el tiempo de desorción del trap interno. Se inyectan 10 µL de la disolución B en las condiciones óptimas (las referidas en el apartado 4.4).

Se parte de los 5 minutos de desorción fijados inicialmente (que se toman como referencia) y se prueba con 3 y 8 minutos de desorción. En la Figura 10 (Tabla en ANEXO VIII) se observa cómo para mayores tiempos de desorción se obtienen mejores recuperaciones de los analitos, lo que indica que en condiciones anteriores no teníamos transferencias cuantitativas.

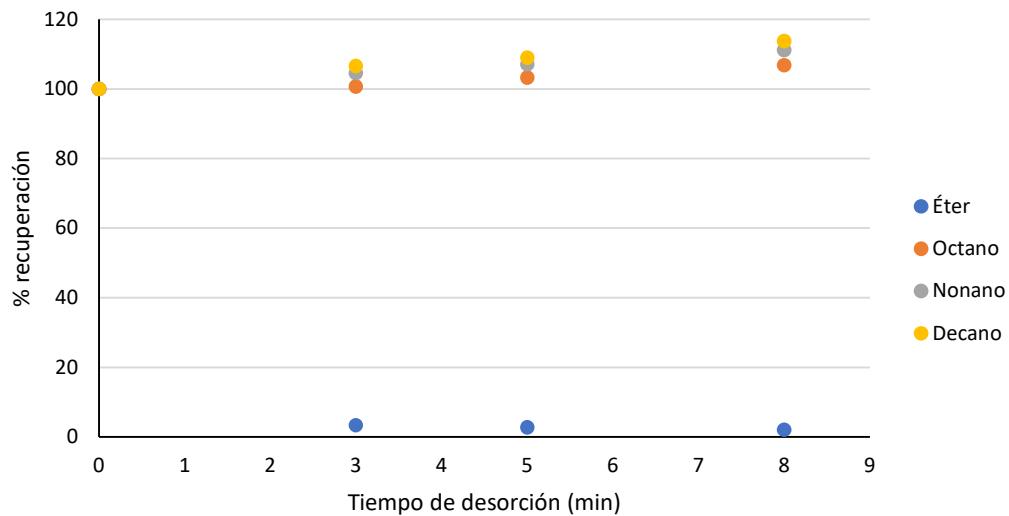


Figura 10. Representación de los porcentajes de recuperación de analito y de éter residual a 30°C (la temperatura considerada como óptima) frente a distintos tiempos de desorción del trap interno.

Las gráficas con condiciones similares pero a temperaturas inferiores del trap interno, confirman que ésta es crítica, obteniéndose cantidades de éter muy superiores (ver ANEXO V, VI y VII).

Las condiciones óptimas de temperatura de la trampa fría y tiempo de desorción son 30°C y 8 minutos respectivamente. En la Figura 11 (Tabla en ANEXO IX) se pueden observar los porcentajes de éter remanente en las condiciones dadas como óptimas. Al ser la temperatura del trap interno el factor determinante en la eliminación del éter, se aprecia como el resto de variables (tiempo de desorción en los porcentajes de recuperación de analitos y tiempo de secado para el porcentaje de éter residual) son apenas influyentes.

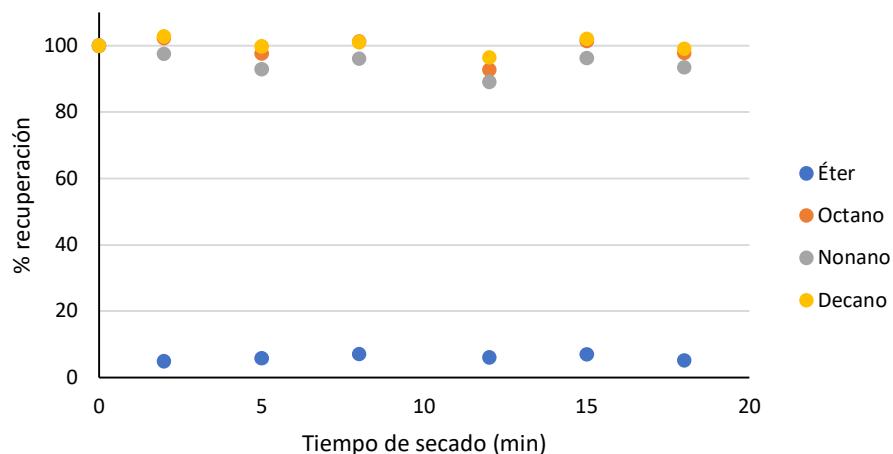


Figura 11. Representación de los porcentajes de recuperación de los analitos frente al tiempo de secado del trap externo, en las condiciones fijadas como óptimas para la inyección de 10 µL.

4.6 Inyecciones de volúmenes mayores

Para confirmar que las condiciones óptimas (tiempo de secado del trap externo de 2 minutos, flujo de gas portador de 50 mL/min, temperatura de focalización del trap interno de 30°C, y tiempo de desorción del trap interno de 8 minutos) para los 10 µL de la disolución B son igualmente efectivas para volúmenes de inyección mayores, se inyectan 50 µL de la disolución C y 100 µL de la disolución D. De este modo, al inyectar la misma masa de analitos en el cromatógrafo, pero un volumen mayor de éter, se puede comparar si los porcentajes de recuperación de cada compuesto son similares entre los diferentes volúmenes de inyección. En la Figura 12 (Tabla en ANEXO X) se observa cómo al inyectar 50 µL de la disolución C y mantener las condiciones óptimas de la inyección de 10 µL, la cantidad de éter residual es mayor. Para obtener porcentajes similares de éter entre los dos volúmenes de inyección -que no volúmenes remanentes- los tiempos de secado del trap externo deben de ser más largos. Lo mismo ocurre en la Figura 13 (ver en ANEXO XI), donde las inyecciones de 100 µL requieren tiempos de secado incluso mayores.

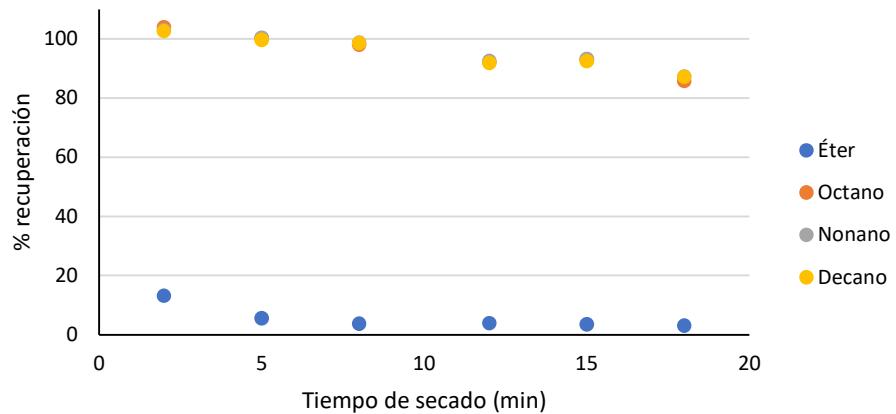


Figura 12. Representación de los porcentajes de recuperación de los compuestos de la disolución C, con inyecciones de 50 µL.

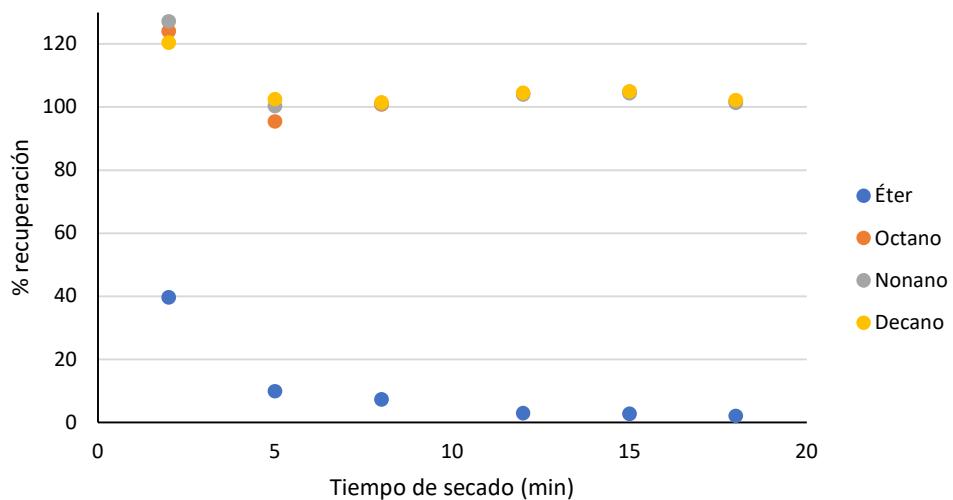


Figura 13. Representación de los porcentajes de recuperación de los compuestos de la disolución D, con inyecciones de 100 µL.

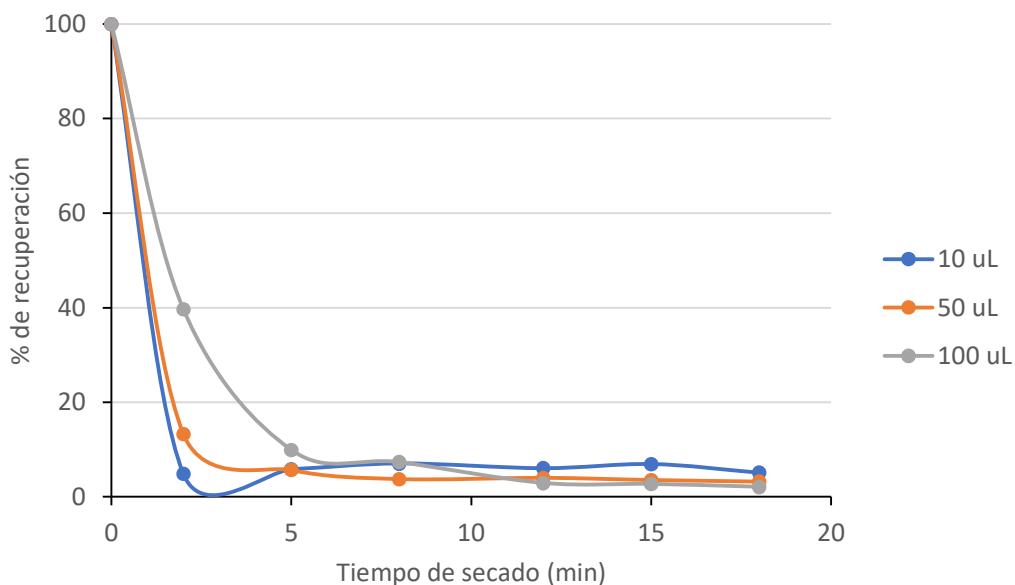


Figura 14. Comparación de los porcentajes de éter residual frente al tiempo de secado del trap externo con volúmenes de 10, 50 y 100 μL . Temperatura del trap interno: 30°C

En la Figura 14 se observa que el tiempo de secado del trap externo es proporcional al volumen de inyección de la muestra, es decir, para volúmenes de inyecciones mayores, el tiempo de secado del trap deberá de ser mayor para obtener porcentajes de éter remanente similares.

En la Figura 15 se superponen los picos de éter en los cromatogramas de 10, 50 y 100 μL de manera que se aprecia cualitativamente la diferencia de volumen residual que entra en el cromatograma en unas mismas condiciones, aun siendo porcentajes de éter remanente similares.

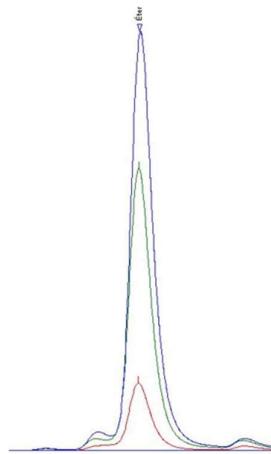


Figura 15. Picos de éter residual (10 de color rojo, 50 de color verde y 100 μL de color azul) superpuestos en un mismo cromatograma.

Para conseguir que entre al cromatógrafo la misma masa de éter en las inyecciones de 10, 50 y 100 μL , deberán programarse temperaturas de focalización mayores -cuanto mayor es la masa de éter introducida, más cuesta desprenderse de la parte retenida en el adsorbente. Por ejemplo, un 5% de éter remanente introducido en el cromatógrafo es una masa muy diferente si

el volumen inyectado es de 10 μL o de 100. En la Figura 16 (ver en ANEXO XII) y en la Figura 17 (ver en ANEXO XIII) el objetivo es encontrar una temperatura de focalización que permita la introducción de menos de 1 μL de éter en el sistema cromatográfico, si es posible. Para ello, deberán de obtenerse porcentajes de recuperación de éter de un 2% para las inyecciones de 50 μL , y de un 1% para las de 100 μL . Para desorciones de 3 y 5 minutos, ver ANEXOS XIV y XV.

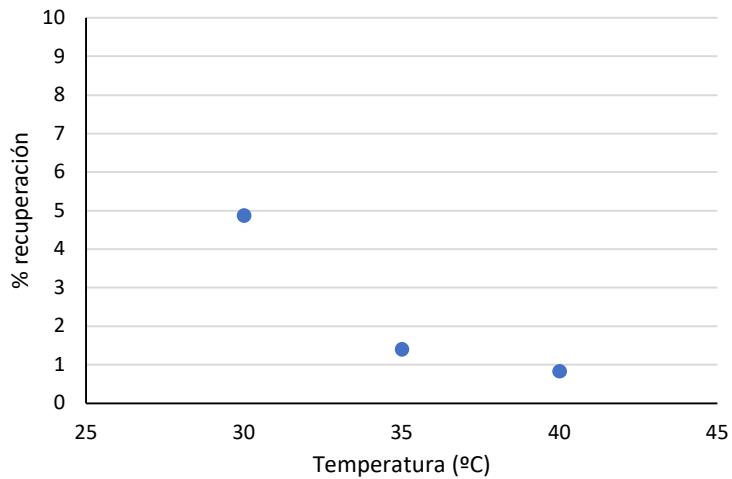


Figura 16. Porcentajes de recuperación de los compuestos de la disolución C con distintas temperaturas de focalización del trap interno. Inyecciones de 50 μL . Inyección en condiciones consideradas óptimas para el resto de variables.

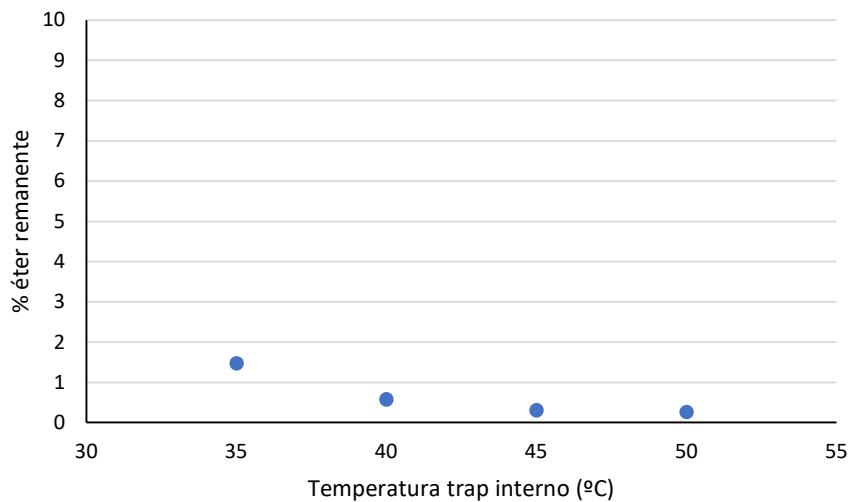


Figura 17. Porcentajes de recuperación de los compuestos de la disolución D con distintas temperaturas de focalización del trap interno. Inyecciones de 100 μL . Inyección en condiciones consideradas óptimas para el resto de variables.

Se comprueba experimentalmente que los tiempos de secado solo influyen en la etapa de adsorción de la inyección de la muestra al Tenax TA. Al inyectar volúmenes mayores de líquido en el sistema de desorción, los tiempos de secado deberán de ser mayores, no sólo para conseguir que los analitos se adsorban mejor al tubo de adsorbente y evitar pérdidas significativas de los

mismos en la posterior etapa de eliminación de éter (durante la focalización en el trap interno), sino también para impedir en lo posible la saturación del sistema. La temperatura de focalización de los analitos en la inyección es la variable más influyente, para la que se podría fijar 30°C para todos los tipos de inyecciones, ya que el porcentaje de éter remanente en las inyecciones a 30, 35, 40°C e incluso temperaturas superiores era similar, como se observa en la Tabla 6.

Tabla 6. En la primera fila, porcentajes de éter residual a distintos tiempos de secado del trap externo. En la segunda fila, uL de éter que entran al cromatógrafo. Inyecciones de 10, 50 y 100 µL. El resto de condiciones eran las mismas para las tres inyecciones (temperatura de focalización de 30°C, desorción de 8 minutos).

		Tiempo de secado (min)					
		0	2	5	8	12	15
% éter residual	10 µL	100	4,8	5,8	7,0	6,0	6,9
	50 µL	100	13,3	5,7	3,7	4,0	3,5
	100 µL	100	39,7	9,9	7,3	2,9	2,1
µL en el trap restantes	10 µL	10	0,5	0,6	0,7	0,6	0,7
	50 µL	50	6,6	2,8	1,9	2,0	1,8
	100 µL	100	39,7	9,9	7,3	2,9	2,1

Aunque temperaturas mayores podrían implicar pérdidas significativas de compuestos químicos con puntos de ebullición bajos (considérense aquellos entre el éter y el octano), según las proporciones observadas en la Figura 15, se resuelve fijar la temperatura de focalización para las inyecciones de 50 µL en 35°C, y 40°C para las de 100 µL, de modo que siempre quede 1 µL de éter residual en cada inyección, como puede observarse en las Figuras 16 y 17.

Las mejores condiciones para cada tipo de inyección se resumen en:

- 10 µL: tiempo de secado del trap externo de 2 minutos, flujo de gas portador de 50 mL/min, temperatura de focalización del trap interno de 30°C, y tiempo de desorción del trap interno de 8 minutos.
- 50 µL: tiempo de secado del trap externo de 8 minutos, flujo de gas portador de 50 mL/min, temperatura de focalización del trap interno de 35°C, y tiempo de desorción del trap interno de 8 minutos.
- 100 µL: tiempo de secado del trap externo de 12 minutos, flujo de gas portador de 50 mL/min, temperatura de focalización del trap interno de 40°C, y tiempo de desorción del trap interno de 8 minutos.

4.7 Determinación de índices de retención experimentales

Para identificar los compuestos de las disoluciones de ésteres y alcoholes en las sesiones olfatométricas, se inyectan 10 µL de la disolución E (alcanos) en las condiciones óptimas fijadas para este volumen, de manera que los tiempos de retención de los alcanos servirán para el cálculo de los índices de retención experimentales (I) según la siguiente función (Ecuación 2):²³

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{\log(t'_{r(\text{desconocido})}) - \log(t'_{r(n)})}{\log(t'_{r(N)}) - \log(t'_{r(n)})} \right] \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde n es el número de átomos de carbono en el alcano que eluya inmediatamente antes que el compuesto en el tiempo de olfacción, N es el número de átomos de carbono en el alcano que eluya inmediatamente después, $t_{r(n)}$ y $t_{r(N)}$ son los tiempos de retención del alcano más pequeño y más grande respectivamente, y $t_{r(\text{desconocido})}$ es el tiempo de retención del compuesto oido.

4.8 Sesiones olfactométricas

Para demostrar que las condiciones optimizadas son aplicables en análisis de muestras reales, se aplican las diferentes condiciones óptimas en disoluciones sintéticas de diferentes grupos funcionales (disoluciones G, F, H e I). La identificación de los picos de los compuestos de la disolución se lleva a cabo en diferentes sesiones olfactométricas, donde se intentan cotejar los índices de retención teóricos de los analitos con sus respectivos tiempos de detección olfactométrica (con los que se calculan los índices experimentales), recogidos en la Tabla 7.

Tabla 7. Índices de retención^a y descriptores olfativos^b reportados en Pherobase,²⁴ e índices de retención calculados experimentalmente para cada compuesto.

Compuesto	IR teórico ^a	IR experimental	Descriptor olfativo ^b
Acetato de etilo	890	No detectado	Caramelo, dulce, disolvente
Propanoato de etilo	950	966	Afrutado, disolvente, acetona
Butirato de etilo	1022	1044	Afrutado, plátano, fresa
Pentanoato de etilo	1147	1145	Afrutado, naranja, hierba
Hexanoato de etilo	1244	1248	Afrutado, fresa, anisado
Isopropanol	947	922	Éter, alcohol
Isobutanol	1081	1089	Disolvente, ácido, pegamento
Butanol	1121	1106	Afrutado, medicinal, queso
Alcohol isoamílico	1215	1226	Cebolla, queso, afrutado
Pentanol	1244	isoamílico	Coelución con Afrutado, verde, dulce
Hexanol	1359	1376	Floral, hierba, seco
Heptanol	1443	1489	Fresco, verde, fruto seco

Se inyectan 10 μL de la disolución F (se hará lo mismo con la disolución H) con las condiciones óptimas para los 10 μL de inyección. Posteriormente se inyectan 100 μL de la disolución G (se hará lo mismo con la disolución I) con las condiciones optimizadas para los 100 μL de inyección, por duplicado. Se calculan los porcentajes de recuperación de estas inyecciones en sus condiciones óptimas respecto a su referencia, se obtienen los resultados de las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Porcentaje de compuesto recuperado (ésteres), inyecciones de 10 y 100 μL optimizadas frente a referencias . Ambas inyecciones se hicieron por duplicado.

Compuesto	Inyección 10 μL	Inyección 100 μL
Éter	4,9 \pm 23,3	74,8 \pm 16,9
Acetato etilo	No recuperado	No recuperado
Propanoato etilo	69,1 \pm 28,7	35,7 \pm 6,6
Butirato etilo	77,5 \pm 15,2	109,1 \pm 0,8
Pentanoato etilo	71,3 \pm 14,7	113,7 \pm 0,4
Hexanoato etilo	87,8 \pm 3,4	95,4 \pm 4,1

Tabla 9. Porcentaje de compuesto recuperado (alcoholes), inyecciones de 10 y 100 μL optimizadas frente a referencias . Ambas inyecciones se hicieron por duplicado.

Compuesto	Inyección 10 μL	Inyección 100 μL
Éter	5,3 \pm 9,6	82,8 \pm 13,6
Isobutanol	No recuperado	No recuperado
Butanol	0,8 \pm 1,2	43,9 \pm 1,3
Hexanol	96,0 \pm 7,1	86,5 \pm 1,1
Heptanol	110,6 \pm 8,6	97,9 \pm 3,1
Isoamílico+Pentanol	100,6 \pm 9,2	81,3 \pm 1,6
Isopropanol	No recuperado	No recuperado

Como era de esperar, los compuestos más pequeños y polares -similares al éter, entre C6 y C8 y menores- sufren las pérdidas más significativas, con porcentajes de recuperación de los mismos muy por debajo del porcentaje de recuperación mínimo del 90% propuesto (ver en Tablas 8 y 9). El acetato de etilo en la serie de ésteres y el butanol e isobutanol en la de alcoholes se pierden completamente. Otros compuestos como el propanoato de etilo sufre pérdidas de más del 50% de concentración y los alcoholes, al ser más volátiles que los ésteres, no se obtienen recuperaciones superiores al 90%.

En las Figuras 18 y 19 puede observarse la integración de los picos de los compuestos cuantificables, y la ausencia de picos de los analitos perdidos completamente (acetato de etilo, isopropanol, butanol e isobutanol).

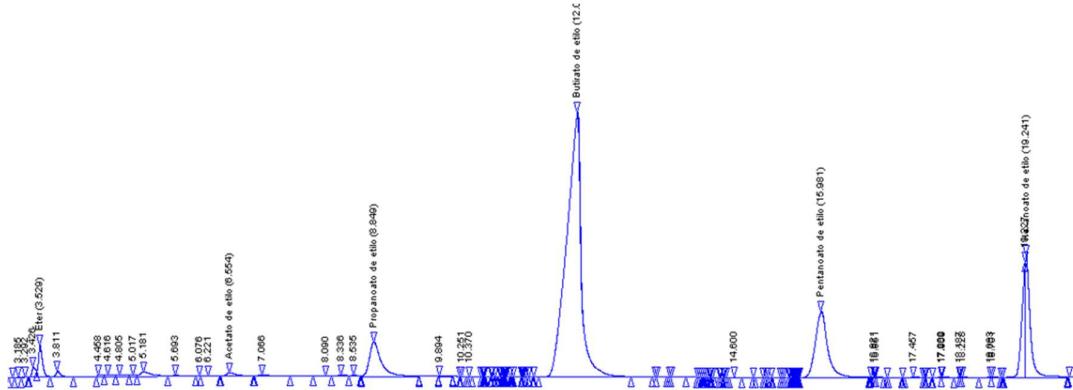


Figura 18. Cromatograma integrado de una inyección de 100 μ L de la disolución G de ésteres.

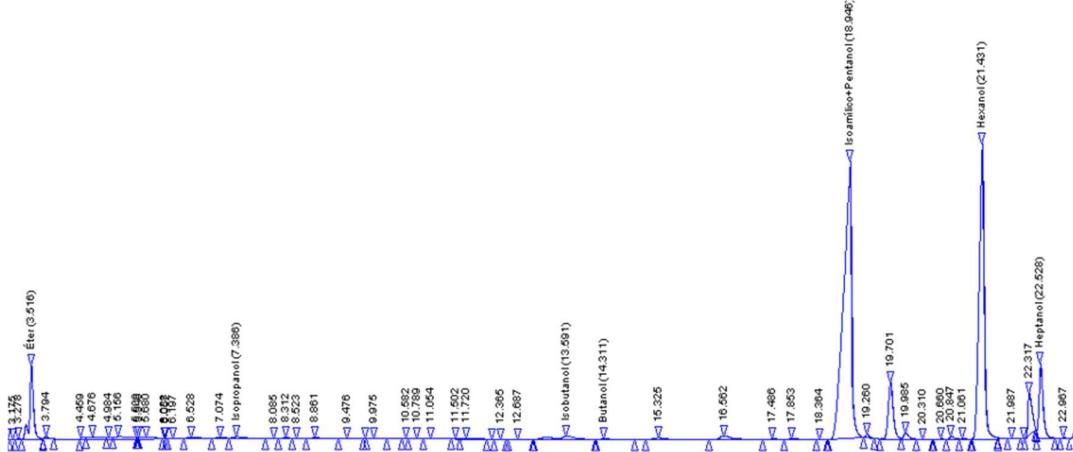


Figura 19. Cromatograma integrado de una inyección de 100 μ L de la disolución I de alcoholes.

5. CONCLUSIONES

Se concluye que el Tenax TA establece unas interacciones excesivamente fuertes con el éter, de manera que no es posible eliminar este disolvente por evaporación sin perder material volátil no polar más pesado en ninguna de las condiciones ensayadas.

Sin embargo, hemos comprobado cómo escogiendo carbón grafitizado en el trap interno, y eligiendo una temperatura en torno a 30°C y un flujo de 50 mL/min durante la focalización, es posible eliminar el 90% de éter por evaporación sin perder más de un 10% de C8-C10.

Este diseño y estas condiciones hacen posible inyectar de manera reproducible volúmenes de extractos contenidos en éter de 100 o más μL , evaporando el éter de manera casi completa y perdiendo tan solo analitos de tamaño similar o inferior al del éter, pero no aquellos que contienen al menos 2 átomos de carbono más que el éter.

REFERENCIAS

1. Song, H.; Liu, J. GC-O-MS technique and its applications in food flavor analysis. *Food Research International*. **2018**, *114*: 187–198; DOI: 10.1016/j.foodres.2018.07.037
2. Plutowska, B.; Wardencki, W. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages - A review. *Food Chemistry*. **2008**, *107* (1): 449–463; DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.08.058
3. De-la-Fuente-Blanco, A., Ferreira, V. Gas Chromatography Olfactometry (GC-O) for the (semi)quantitative screening of wine aroma. *Foods*. **2020**, *9*, 1892; DOI: 10.3390/foods9121892
4. Dabrio, M. V.; et. al. Conceptos Fundamentales. En *Cromatografía de Gases I*, *1^a ed*; Alhambra: Madrid, **1971**; pp 1-18
5. Brattoli, M. Gas Chromatography Analysis with Olfactometric Detection (GC-O) as a Useful Methodology for Chemical Characterization of Odorous Compounds. *Sensors*. **2013**, *13* (12): 16759–16800; DOI:10.3390/s131216759
6. Dabrio, M. V.; et. al. Cromatografía Gas-Sólido. En *Cromatografía de Gases II*, *1^a ed*; Alhambra: Madrid, **1973**; pp 103-108.
7. Dabrio, M. V.; et. al. Diferentes tipos de columnas. En *Cromatografía de Gases I*, *1^a ed*; Alhambra: Madrid, **1971**; pp 86-118.
8. Dabrio, M. V.; et. al. Sistemas de detección. En *Cromatografía de Gases I*, *1^a ed*; Alhambra: Madrid, **1971**; pp 150-159.
9. Dabrio, M. V.; et. al. Cromatografía de gases y espectrometría de masas. Sistema combinado. En *Cromatografía de Gases II*, *1^a ed*; Alhambra: Madrid, **1973**; pp 122-125.
10. Fuller, G. H.; Stellencamp, R.; Tisserand, G. A. The gas chromatograph with human sensor: Perfumer model. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1964**, *116* (2): 711–724; DOI:10.1111/j.1749-6632.1964.tb45106.x
11. Jennings, W.; Poole, C; Milestones in the Development of Gas Chromatography. En *Gas Chromatography*, *2^a ed*, Elsevier: Oxford, **2012**; pp 12-13.
12. Ferreira, V. *Química Analítica II*. Universidad de Zaragoza. Zaragoza (**octubre 2019**).
13. López, P.; Batlle, R.; Nerín, C.; Cacho, J.; Ferreira, V. Use of new generation poly(styrene-divinylbenzene) resins for gas-phase trapping-thermal desorption. Application to the retention of seven volatile organic compounds. *Journal of Chromatography A*. **2007**, *1139*: 36-44; DOI:10.1016/j.chroma.2006.11.005
14. Buchem BV. https://www.buchem.com/product/tenax-porous-polymer-resin/tenax-ta.html?__SID=U (accedido en mayo de 2022).
15. West, C.; Elfakir, C.; Lafosse, M. Porous graphitic carbon: A versatile stationary phase for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2010**, *1217*: 3201-3216; DOI: 10.1016/j.chroma.2009.09.052
16. Knox, J. H.; Kaur, B.; Millward, G.R. Structure and performance of porous graphitic carbon in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. **1986**, *352*: 3-25; DOI: 10.1016/S0021-9673(01)83368-9
17. Tadsanaprasittipol, A.; Akiyama, K. Basic Study of Automotive Exhaust Hydrocarbons Using Thermal Desorption (first Report). Solubility of Adsorbents for Thermal Desorption Tube in Organic Solvents. *JARI Research Journal*. **2009**, *31* (4): 155-157.
18. Sánchez, E. Evaluación de un método de extracción con microcámaras, desorción térmica y GC-O para detección de aromas en vino. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Rovira i Virgili, Tarragona, **2018**.
19. MARKES International. <https://markes.com/> (accedido en abril 2022).

20. Campo, E.; Cacho, J.; Ferreira, V. Multidimensional chromatographic approach applied to the identification of novel aroma compounds in wine. Identification of ethyl cyclohexanoate, ethyl 2-hydroxy-3-methylbutyrate and ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate. *Journal of Chromatography A.* **2006**, *1137*: 223-230; DOI: 10.1016/j.chroma.2006.10.020
21. Campo, E.; Ferreira, V.; López, R.; Escudero, A.; Cacho, J. Identification of three novel compounds in wine by means of a laboratory-constructed multidimensional gas chromatography system. *Journal of Chromatography A.* **2006**, *1122*: 202-208
22. *Modern Physics*, 1^a ed.; Serway, A.; Moses, C.; Moyer, C.; Harcourt Brace Jovanovich: Fort Worth, TX, USA, **1989**.
23. *Atlas of Odor Character Profiles*, 1^a ed.; Dravnieks, A.; American Society for Testing and Materials: West Conshohocken, PA, USA, **1985**.
24. Pherobase. Semiochemicals Index.
<https://www.pherobase.com/database/compound/compounds-index.php> (**acceso en abril de 2022**).

ANEXOS

ANEXO I. Tabla de la Figura 5. 10 uL, 0,3%, flujo 20 mL/min, trap interno a -10°C y desorción de 5 min

Áreas absolutas	Referencia	Tiempo de secado (min)			
		10 min	5 min	2 min	1 min
Éter	17179952	8896886	9367706	12319613	16515268
Octano	138563680	114099160	128766456	132468184	131571600
Nonano	146700720	119913768	134504048	136996384	136659600
Decano	155251344	127005608	140323376	144430464	142936416
% recuperación					
Éter	100	51,8	54,5	71,7	96,1
Octano	100	82,3	92,9	95,6	95,0
Nonano	100	81,7	91,7	93,4	93,2
Decano	100	81,8	90,4	93,0	92,1

ANEXO II. Tabla de la Figura 6. 10 uL, 0,3%, flujo 50 mL/min, trap interno a -10°C y desorción de 5 min

Áreas absolutas	Referencia	Tiempo de secado (min)			
		10 min	5 min	2 min	1 min
Éter	17179952	8619775	10505480	11056322	12013906
Octano	138563680	126269496	132586280	132849496	143355632
Nonano	146700720	132956944	138923552	139428368	151511952
Decano	155251344	139904688	145263520	146098144	159221264
% recuperación					
Éter	100	50,2	61,1	64,4	69,9
Octano	100	91,1	95,7	95,9	103,5
Nonano	100	90,6	94,7	95,0	103,3
Decano	100	90,1	93,6	94,1	102,6

ANEXO III. Tabla de la Figura 7. 10 uL, 0,04%, flujo 20 mL/min, trap interno a -10°C y desorción de 5 min

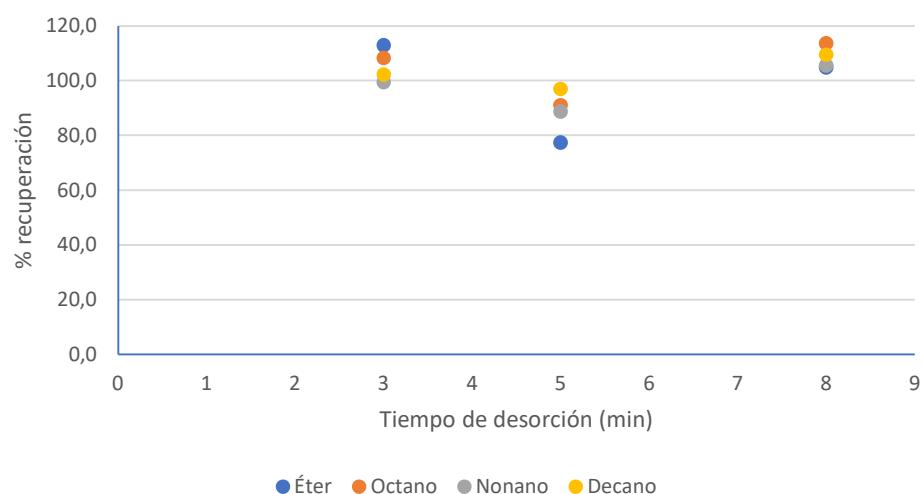
Áreas absolutas	Referencia	Tiempo de secado (min)			
		1 min	2 min	5 min	10 min
Éter	16865788	16125320	14236177	12628948	9047304
Octano	16389295	15442784	15128578	14711869	11664856
Nonano	17804972	16765314	16433427	15856102	13210486
Decano	17670746	17197322	16793780	16361624	14477685
% recuperación					
Éter	100	95,6	84,4	74,9	53,6
Octano	100	94,2	92,3	89,8	71,2
Nonano	100	94,2	92,3	89,1	74,2
Decano	100	97,3	95,0	92,6	81,9

ANEXO IV. Tabla de la Figura 8. 10 uL, 0,04%, flujo 50 mL/min, trap interno a -10°C y desorción de 5 min

Áreas absolutas	Referencia	Tiempo de secado (min)			
		1 min	2 min	5 min	10 min
Éter	21043030	19254604	17060030	16483991	10206124
Octano	15655575	17743284	18719772	18586276	14390185
Nonano	15631575	17896030	19111074	18972980	15357617
Decano	15951550	18345082	19642958	19461296	15783238
% recuperación					
Éter	100	91,5	81,1	78,3	48,5
Octano	100	113,3	119,6	118,7	91,9
Nonano	100	114,5	122,3	121,4	98,2
Decano	100	115,0	123,1	122,0	98,9

ANEXO V_A. 10 uL, 0,04%, flujo 50 mL/min, tiempo de secado del trap externo de 2 min, trap interno a -10°C

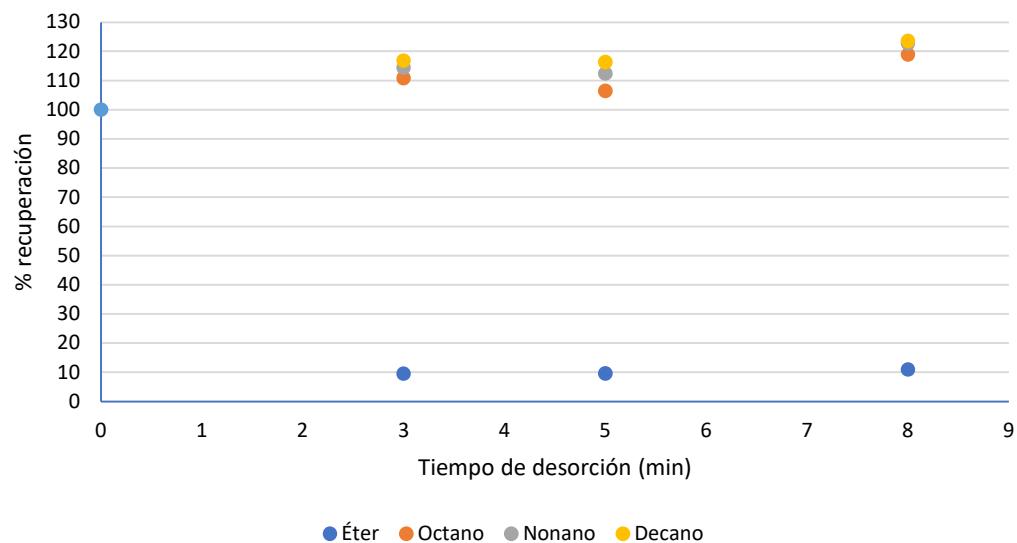
Áreas absolutas	Referencia	Tiempo de desorción (min)		
		3 min	5 min	8 min
Éter	16865788	19040612	13063468	17689216
Octano	16389295	17753480	14914953	18626084
Nonano	17804972	17714426	15798956	18792936
Decano	17670746	18064376	17126274	19355252
% recuperación				
Éter	100	112,9	77,5	104,9
Octano	100	108,3	91,0	113,6
Nonano	100	99,5	88,7	105,5
Decano	100	102,2	96,9	109,5



ANEXO V_B. Inyección 10 uL, 0,04%, flujo 50 mL/min, tiempo de secado de 2 min, temperatura focalización -10°C.

ANEXO VI_A. 10 uL 0,04%, flujo 50 mL/min, tiempo de secado del trap externo de 2 min, trap interno a 10°C

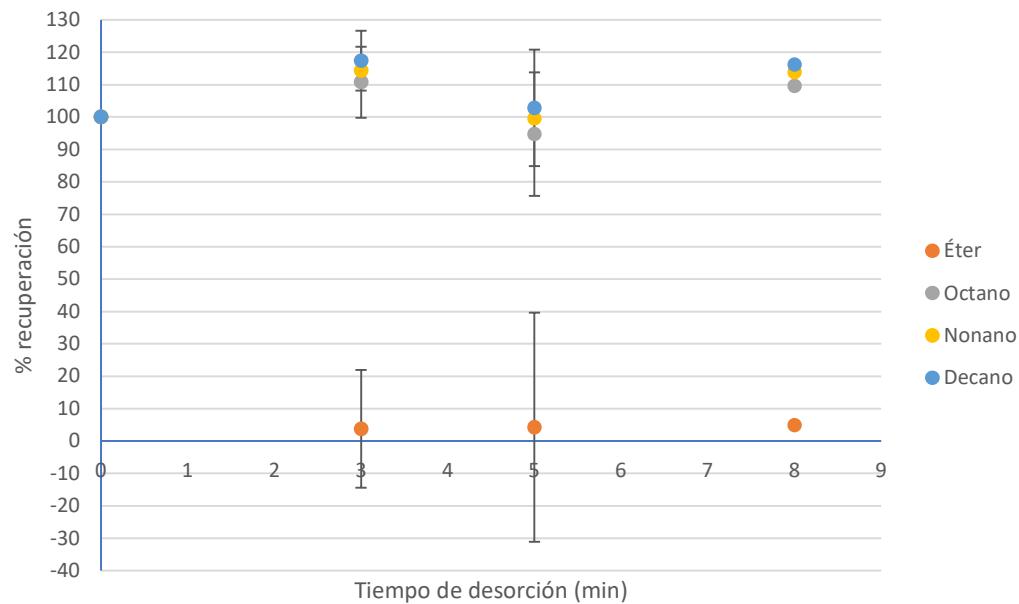
Áreas absolutas	Referencia	Tiempo de desorción (min)		
		3 min	5 min	8 min
Éter	21043030	2001281	2022108	2297662
Octano	15655575	17362448	16665882	18607750
Nonano	15631575	17886760	17577050	19190950
Decano	15951550	18645138	18549996	19699550
% recuperación				
Éter	100	9,5	9,6	10,9
Octano	100	110,9	106,4	118,9
Nonano	100	114,4	112,4	122,8
Decano	100	116,9	116,2	123,5



ANEXO VI_B. Inyección 10 uL, 0,04%, flujo 50 mL/min, tiempo de secado de 2 min, temperatura focalización 10°C.

ANEXO VII_A. 10 uL, 0,04%, flujo 50 mL/min, tiempo de secado del trap externo de 2 min, trap interno a 20°C

Áreas absolutas	Referencia	Tiempo de desorción (min)		
		3 min	5 min	8 min
Éter	21043030	794675	900323	1031742
Octano	15655575	17343982	14837095	17155578
Nonano	15631575	17872323	15560029	17797746
Decano	15951550	18727531	16408847	18538508
% recuperación				
Éter	100	3,8±0,2	4,3±18,2	4,9±35,4
Octano	100	110,8±0,2	94,8±12,1	109,6±19,7
Nonano	100	114,3±0,7	99,5±11,0	113,9±19,1
Decano	100	117,4±0,9	102,9±9,3	116,2±18,0



ANEXO VII_B. Inyección 10 uL, 0,04%, flujo 50 mL/min, tiempo de secado de 2 min, temperatura focalización 20°C.

ANEXO VIII. Tabla de la Figura 10. 10 uL, 0,04%, flujo 50 mL/min, tiempo de secado del trap externo de 2 min, trap interno a 30°C

Áreas absolutas	Referencia	Tiempo de desorción (min)		
		3 min	5 min	8 min
Éter	21043030	1086266	955353	814641
Octano	15655575	15805758	16206083	16758343
Nonano	15631575	16335662	16732129	17365232
Decano	15951550	17019832	17409038	18164542
% recuperación				
Éter	100	3,3	2,7	2,1
Octano	100	100,7	103,2	106,8
Nonano	100	104,5	107,0	111,1
Decano	100	106,5	109,0	113,7

ANEXO IX. Tabla de la Figura 11. 10 uL, 0,04%, flujo 50 mL/min, trap interno a 30°C, desorción de 8 min

Áreas absolutas	Referencia	Tiempo de secado (min)					
		2	5	8	12	15	18
Éter	16865788	814641	978572	1187319	1017678	1165617	861029
Octano	16389295	16758343	16003140	16586207	15191234	16615472	16035252
Nonano	17804972	17365232	16547520	17101098	15859090	17141864	16635988
Decano	17670746	18164542	17629246	17851646	17034230	18033260	17510016
% recuperación							
Éter	100	4,8	5,8	7,0	6,0	6,	5,1
Octano	100	102,3	97,6	101,2	92,7	101,4	97,8
Nonano	100	97,5	92,9	96,0	89,1	96,3	93,4
Decano	100	102,8	99,8	101,0	96,4	102,1	99,1

ANEXO X. Tabla de la Figura 12. 50 uL, 1:5, flujo 50 mL/min, trap interno a 30°C, desorción de 8 min

Áreas absolutas	Tiempo de secado (min)					
	2	5	8	12	15	18
Éter	13298727	5666468	3742530	3981552	3541357	3189654
Octano	18293374	17624444	17247938	16204242	16377161	15087184
Nonano	18356784	17904910	17589730	16501363	16622079	15568077
Decano	19026220	18487812	18280506	17027082	17135446	16162105
% recuperación						
Éter	13,3	5,6	3,7	4,0	3,5	3,2
Octano	104,0	100,2	98,1	92,2	93,1	85,8
Nonano	103,0	100,5	98,7	92,6	93,3	87,3
Decano	102,7	99,8	98,7	92,0	92,5	87,2

ANEXO XI. Tabla de la Figura 13. 100 uL, 1:10, flujo 50 mL/min, trap interno a 30°C, tiempo de desorción de trap interno de 8 min

Tiempo de secado (min)						
Áreas absolutas	2	5	8	12	15	18
Éter	79535064	19787556	14702756	5828767	5407351	4155825
Octano	21810228	16785538	17716386	18337968	18419340	17910080
Nonano	22671578	17878572	18007838	18512934	18605992	18059158
Decano	22303364	18986154	18788470	19360346	19451362	18932416
% de recuperación						
Éter	39,6	9,9	7,3	2,9	2,7	2,1
Octano	124,0	95,5	100,8	104,3	104,8	101,9
Nonano	127,2	100,3	101,0	103,9	104,4	101,3
Decano	120,0	102,5	101,4	104,5	105,0	102,2

ANEXO XII. Tabla de la Figura 16. 50 uL, 1:5, 50 mL/min, tiempo de secado de 8 min, desorción de 8 min

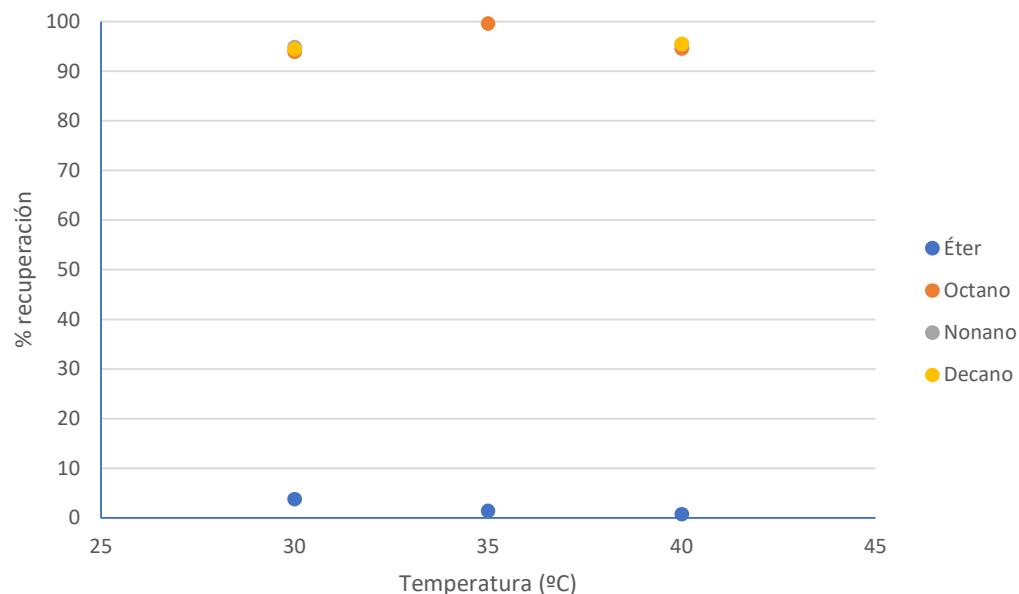
T ^a trap interno			
Áreas absolutas	30°C	35°C	40°C
Éter	4885290	1404510	836631
Octano	15609109	17483238	16744541
Nonano	15903406	17901480	17081806
Decano	16488173	18598804	17779842
% recuperación			
Éter	4,9	1,4	0,8
Octano	88,8	99,4	95,2
Nonano	89,2	100,4	95,8
Decano	89,0	100,4	96,0

ANEXO XIII. Tabla de la Figura 17. 100 uL, 1:10, flujo 50 mL/min, tiempo de secado de 12 min, desorción de 8 min.

T ^a trap interno (°C)	35	40	45	50
% éter residual	1,5	0,6	0,3	0,3

ANEXO XIV_A. 50 uL, 1:5, 50 mL/min, tiempo de secado de 8 min, desorción de 3 min.

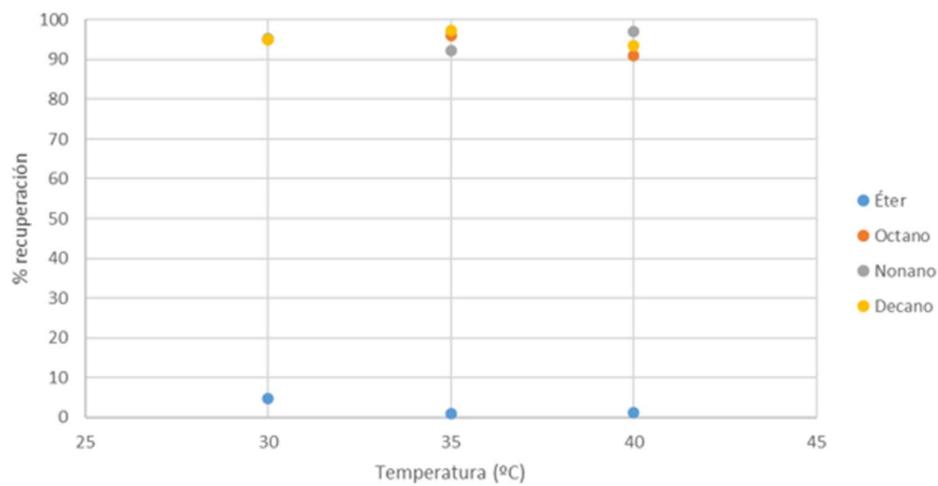
Áreas absolutas	T ^a trap interno		
	30°C	35°C	40°C
Éter	3782237	1431501	738263
Octano	16505594	17509252	16623285
Nonano	16906308	17926568	17004018
Decano	17498332	18607936	17688258
% recuperación			
Éter	3,8	1,4	0,7
Octano	93,9	100,0	94,5
Nonano	94,9	100,6	95,4
Decano	94,4	100,4	95,5



ANEXO XIV_B. Inyección 50 uL, 1:5, flujo 50 mL/min, tiempo de secado de 8 min, desorción de 3 min

ANEXO XV_A. 50 uL, 1:5, 50 mL/min, tiempo de secado de 8 min, desorción de 5 min.

Áreas absolutas	T ^a trap interno		
	30°C	35°C	40°C
Éter	4795214	1032121	1060894
Octano	16703211	16871736	16011341
Nonano	16962322	17278520	16436010
Decano	17610540	18030030	17308666
% recuperación			
Éter	4,8	1,0	1,1
Octano	95,0	96,0	91,1
Nonano	95,2	96,9	92,2
Decano	95,0	97,3	93,4



ANEXO XV_B. Inyección 50 uL, 1:5, flujo 50 mL/min, tiempo de secado de 8 min, desorción de 5 min